



Rôle des Pili de type IV dans le réarrangement de la surface cellulaire eucaryote induite par *Neisseria meningitidis* et conséquences sur la colonisation des barrières cellulaires

Guillain Mikaty

► To cite this version:

Guillain Mikaty. Rôle des Pili de type IV dans le réarrangement de la surface cellulaire eucaryote induite par *Neisseria meningitidis* et conséquences sur la colonisation des barrières cellulaires. Bactériologie. Université Paris Descartes, 2009. Français. NNT : . tel-01262387

HAL Id: tel-01262387

<https://hal.science/tel-01262387>

Submitted on 26 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - ShareAlike| 4.0 International License

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

THÈSE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR

Sciences de la Vie et de la Santé

Ecole Doctorale : Gc2iD

Discipline : Biologie Cellulaire et Microbiologie

Présentée par

Guillain MIKATY

**Rôle des Pili de type IV dans le réarrangement de la
surface cellulaire eucaryote induite par *Neisseria
meningitidis* et conséquences sur la colonisation des
barrières cellulaires**

Soutenue publiquement le Vendredi 2 octobre 2009 devant le jury composé de :

Pr. Xavier NASSIF	Président
Dr. Guillaume DUMENIL	Directeur de thèse
Dr. Guy TRAN VAN NHIEU	Rapporteur
Dr. Olivera FRANCETIC	Rapporteur
Dr. Ivan MATIC	Examineur
Dr. Jean-marc GHIGO	Examineur

Neisseria meningitidis est une bactérie à Gram négatif, à la fois commensale et pathogène de l'espèce humaine. Au cours de ces travaux, nous nous sommes intéressés à l'interaction entre cette bactérie et son hôte. La colonisation des cellules par *N. meningitidis* est un processus complexe qui intègre : l'adhésion aux cellules de l'hôte dépendante de la présence de Pili de type IV (Pt4), la multiplication et la survie des bactéries, la formation de microcolonies et leur maintien sur les cellules puis l'envahissement progressif de la surface cellulaire. Cette étape de colonisation est centrale dans le cycle commensal et dans la pathogenèse de cette bactérie. Elle a donc été largement étudiée par le passé. Cependant deux aspects avaient été négligés dans la plupart de ces études. (1) La colonisation des cellules humaines se fait dans un contexte de flux de liquides, mucus ou sang, qui génère des forces hydrodynamiques qui s'opposent à la colonisation. (2) L'interaction entre une bactérie et une cellule eucaryote implique une participation de chacune des deux cellules. La colonisation des cellules humaines par *N. meningitidis* induit plusieurs changements physiologiques dont une réorganisation complexe du cytosquelette d'actine aboutissant à la formation de projections membranaires à la surface des cellules hôte. C'est donc en intégrant ces deux aspects que nous avons abordé la question de la colonisation de l'hôte par *N. meningitidis*. Ces travaux de thèse ont permis de montrer que la réorganisation du cytosquelette d'actine induite par la bactérie participait activement à la colonisation. La formation des projections membranaires permet à la plupart des bactéries au sein de la microcolonie, d'établir des liaisons robustes avec la membrane plasmique. Ces liaisons sont les seules qui permettent à *N. meningitidis* de résister aux forces hydrodynamiques présentes dans son environnement naturel. De plus, nous avons montré que les Pt4 de la bactérie sont le vecteur moléculaire de l'induction de la réorganisation du cytosquelette. Nous avons identifié deux protéines dans ces pili qui assurent la fonction inductrice. Ces protéines, les pilines mineures PilV et PilX, sont nécessaires à l'induction de la réorganisation du cytosquelette d'actine, et par conséquent, à la colonisation des cellules humaines par *N. meningitidis*. Dans ces deux pilines mineures, une région particulière caractérisée par un pont disulfure est essentielle à cette fonction. Cette région est exposée à l'extérieur de la bactérie et pourrait agir comme ligand d'un récepteur cellulaire. Ces travaux ont associés une nouvelle fonction aux Pt4 de la bactérie. De plus, nous avons découvert une fonction inédite à cette réponse cellulaire dans la colonisation de *N. meningitidis*. Le détournement des voies de signalisation de la cellule hôte permet à la bactérie de résister aux conditions hydrodynamiques de son environnement naturel.

Mots clefs : Colonisation, *N. meningitidis*, Pili de type IV, pilines mineures, Cytosquelette d'actine, réarrangement de la surface cellulaire, Forces hydrodynamiques

SOMMAIRE

I.	INTRODUCTION	4
A.	CYCLES DE VIE DE NEISSERIA MENINGITIDIS	5
I.	<i>Le cycle commensal.....</i>	6
1.	Colonisation du nasopharynx	7
2.	Survie et croissance	10
3.	Modifications génétiques et morphologiques des cellules hôtes	11
4.	Modifications génétiques et morphologiques des bactéries	11
5.	Echappement au système immunitaire	12
6.	Transmission de la bactérie	18
II.	<i>La voie pathogène</i>	19
1.	Franchissement de l'épithélium	20
2.	Croissance et survie dans le sang	21
3.	Colonisation de l'endothélium sanguin.....	22
4.	Franchissement de la barrière hémato-encéphalique	23
III.	<i>Transition commensal-pathogène</i>	24
1.	Facteurs environnementaux	25
2.	Susceptibilité de l'hôte	25
3.	Virulence de la bactérie.....	26
B.	ROLE DES PILI DE TYPE IV DANS LA COLONISATION.....	28
I.	<i>Les fimbriae.....</i>	29
II.	<i>Biogenèse des Pili de type IV.....</i>	30
1.	La piline	31
2.	Structure du pilus	33
3.	La prépiline peptidase	34
4.	Le piston.....	35
5.	L'énergie	35
6.	La sécrétine	36
7.	Le cas particulier de PilC	37
8.	Les autres pilines.....	38
9.	Les autres protéines.....	40
III.	<i>Fonctions associées aux Pili de type IV.....</i>	40
1.	Adhésion	41
2.	Agrégation.....	43
3.	Compétence.....	44
4.	Motilité.....	45
5.	Transduction de signaux cellulaires.....	46
C.	LA CELLULE EUCARYOTE FACE A LA COLONISATION	47
I.	<i>Modulation du cytosquelette d'actine par les pathogènes</i>	48
1.	Listeria	48
2.	Shigella.....	49
3.	EPEC	50
II.	<i>Réorganisation du cytosquelette d'actine induite par les Neisseria.....</i>	51
1.	Remodelage de la membrane plasmique.....	51
2.	La plaque corticale	52
3.	De la plaque corticale à l'actine : les ERM.....	53
4.	Recrutement et polymérisation de l'actine.....	54
5.	Induction et conséquences de la réponse cellulaire.....	55
D.	LA COLONISATION DANS LE CONTEXTE CIRCULATOIRE	57
I.	<i>Les contraintes de cisaillement</i>	57
1.	Définition	57
2.	Mesures	58
II.	<i>Effet des forces hydrodynamiques sur les cellules de l'hôte.....</i>	59
1.	Physiologie des cellules des vaisseaux	59
2.	Comportement des leucocytes	60
III.	<i>Effet des forces de cisaillement sur les bactéries pathogènes.....</i>	61
1.	Escherichia coli Uropathogènes.....	61
2.	Neisseria meningitidis	62

II. OBJECTIFS	64
III. RESULTATS.....	67
A. NEISSERIA MENINGITIDIS INDUIT UN REMODELAGE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE POUR RESISTER AUX FORCES DE CISAILLEMENT	68
B. DEUX PILINES MINEURES SONT NECESSAIRES POUR DECLANCHER LA REORGANISATION DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE INDUITE PAR N. MENINGITIDIS	84
I. <i>Rôle des Pt4 dans le déclenchement de la réorganisation du cytosquelette d'actine.....</i>	84
1. Stratégie expérimentale.....	84
2. L'expression des pili est nécessaire au recrutement de la plaque corticale	85
II. <i>Rôle des protéines Pil dans la transduction du signal par les Pili de type IV.....</i>	87
1. Rôle individuel des protéines « Pil » dans le recrutement de la plaque corticale.....	87
2. La transduction de signal est une fonction indépendante des autres fonctions associées aux pili.....	88
3. Rôle de la protéine PilV dans le recrutement de la plaque corticale.....	89
4. Rôle de la protéine PilX dans le recrutement de la plaque corticale.....	91
5. La protéine PilU régule le recrutement de la plaque corticale.....	92
III. <i>PilV et PilX sont nécessaires à la transduction du signal.....</i>	93
1. PilV et PilX agissent indépendamment l'une de l'autre sur le recrutement de la plaque corticale	93
2. Relations fonctionnelles entre PilU, PilV et PilX	95
IV. <i>Rôle de la région disulfure de PilV et de PilX dans le recrutement de la plaque corticale</i>	96
1. Rôle de la région disulfure de PilX	96
2. Rôle de la région disulfure de PilV	97
V. <i>PilV est localisée dans des pili.....</i>	98
1. La protéine PilV est purifiée avec les Pt4	98
2. La protéine PilV est assemblée dans des pili	99
VI. <i>PilV, mais pas PilX, semble suffisante pour déclencher le recrutement et l'activation de l'eitrine .</i>	100
1. Production et purification des pilines.....	100
2. PilV est suffisante pour recruter de l'eitrine.....	101
3. La présence de PilV déclenche une phosphorylation de l'Eitrine.....	101
IV. MATERIEL ET METHODES	103
V. RESULTATS ANNEXES	110
A. UNE GLYCOSYLATION ALTERNATIVE DECORE LA PILINE DE N. MENINGITIDIS	112
B. UNE MODIFICATION POST-TRADUCTIONNELLE DE LA PILINE DE TYPE IV INDUITE AU CONTACT DES CELLULES HOTE FAVORISE LA COLONISATION DE NOUVEAUX SITES PAR N. MENINGITIDIS.....	115
C. LES PILI DE TYPE IV DU MENINGOCOQUE DECLANCHENT LE RECRUTEMENT DU COMPLEXE DE POLARITE CELLULAIRE PERMETTANT LE FRANCHISSEMENT DE L'ENDOTHELIUM CEREBRAL	118
VI. DISCUSSION	121
VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	140

BREVIEWAIRE

ADN : acide désoxyribonucléique
BFP : Bundle forming pili
BHE : barrière hémato-encéphalique
CREN : Contact regulatory element of *Neisseria*
DUS : DNA uptake sequence
GSP : General secretion pathway
IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IUP : Intrinsically Unstructured Protein
LCR : liquide céphalo-rachidien
LOS : lipooligosaccharide
LPS : lipopolysaccharide
MAC : membrane attack complex
MBP : Maltose binding protein
M β CD : Méthyl- β -cyclodextrine
Pt1 : Pili de type I
Pt4 : Pili de type IV
SST2 : Système de sécrétion de type II
SST3 : Système de sécrétion de type III

I. INTRODUCTION

A. Cycles de vie de Neisseria meningitidis

Neisseria meningitidis, le méningocoque, est une bactérie commensale obligatoire du nasopharynx humain. Pourtant, cette bactérie est principalement connue comme responsable de septicémies fulgurantes et de méningites.

Le méningocoque, diplocoque à Gram négatif, est une α -protéobactérie appartenant à la famille *Neisseriaceae* et au genre *Neisseria*. Le genre *Neisseria* doit son nom à Albert Neisser, découvreur du gonocoque en 1879, et regroupe plusieurs espèces (*N. lactamica*, *N. sicca*, *N. mucosa*, *N. subflava*, et *cetera*) dont deux pathogènes pour l'Homme : *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae*. Comme la plupart des membres du genre, ces deux espèces sont avant tout des commensaux de l'Homme ; le méningocoque colonise la muqueuse nasopharyngée de manière asymptomatique de 10 à 20% des individus selon l'âge et les conditions de vie (Cartwright *et al.*, 1987; Caugant *et al.*, 1994). Cette bactérie ne déclenche de maladie (septicémie et/ou méningite) que dans 1 à 2 cas pour 100.000 habitants en France et dans les pays industrialisés. La mortalité est importante, autour de 10%, malgré des traitements efficaces (Parent du Châtelet *et al.*, 2007). Le cas est différent dans les pays d'Afrique sub-saharienne dits de la « ceinture de la méningite » où le méningocoque est responsable d'épidémies de méningite récurrentes pouvant toucher plusieurs milliers d'individus par an. La plus grave épidémie recensée date de 1996 et a touché plus de 250.000 personnes provoquant près de 25.000 décès (source OMS).

Le gonocoque, quant à lui, est défini comme un agent bactérien d'IST (infections sexuellement transmissibles). Cette bactérie présente un tropisme particulier pour la muqueuse vaginale où il peut être porté sans symptômes alors qu'il semble obligatoirement pathogène pour l'homme, chez qui il est responsable de la blennorragie (Broomes, 1975).

I. Le cycle commensal

Chez les *Neisseria*, de nombreux « outils moléculaires » ont été sélectionnés, au cours de l'évolution, pour l'adaptation à leurs niches écologiques et à leurs modes de transmission. Bien que colonisant des niches différentes, les espèces du genre *Neisseria* sont génétiquement très proches et partagent la plupart de ces outils. Ainsi, on admet que *N. gonorrhoeae* et *N. meningitidis* partagent, pour l'essentiel, les mêmes outils et mécanismes moléculaires. La différence principale entre ces deux bactéries réside dans l'absence de capsule du gonocoque.

La seule niche écologique connue pour *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae* est l'Homme. A ce jour, l'adhésion de ces bactéries n'a jamais été observée sur des cellules d'autres espèces. Il existe des modèles animaux, notamment murins, mimant l'étape de septicémie, mais aucun modèle animal ne permet l'étude de la colonisation des muqueuses ou des vaisseaux sanguins. Pour étudier les cycles commensaux du méningocoque et du gonocoque, plusieurs modèles de cellules humaines épithéliales en culture ainsi que des cultures d'organes ont été développés dans les années 80 (Shaw and Falkow, 1988 ; Stephens *et al.*, 1983 ; Stephens, 1989). Ces modèles ont été enrichis par des études épidémiologiques de portage ainsi que, dans le cas du gonocoque, par une étude d'infection de volontaires (Cartwright *et al.*, 1987 ; Cohen and Cannon, 1999). Les connaissances sur le cycle commensal des *Neisseria* sont donc basées sur l'utilisation de ces modèles et de ces études.

Le cycle commensal de ces bactéries peut se schématiser comme il suit : Une première étape de colonisation : d'abord l'adhésion sur un épithélium, dépendante d'« adhésines » et/ou de Pili, suivie de l'envahissement progressif de la surface de cet épithélium par les bactéries (Figure 1). La prolifération concomitante des bactéries dans ce milieu implique des systèmes de nutriments (captation de nutriments et de fer). De plus, la survie nécessite un mode d'échappement au système immunitaire local. Enfin, un mode de propagation vers un nouvel hôte nécessite que la bactérie se décroche de l'épithélium puis se transmette vers un nouveau site d'adhésion.

1. Colonisation du nasopharynx

a. Colonisation de la muqueuse

La colonisation est un processus complexe qui intègre : l'adhésion initiale, la multiplication et la survie des bactéries, la formation de microcolonies et leur maintien à la surface de la cellule, l'envahissement de la surface de cette cellule et la persistance des bactéries dans cette niche écologique. Dans le but de simplifier cette définition, nous ne nous intéresserons ici qu'à l'adhésion initiale, à la formation de microcolonies et à l'envahissement de la surface de la cellule. Les autres aspects seront traités dans des paragraphes indépendants.

La colonisation des cellules eucaryotes par *N. meningitidis* se fait en deux temps. Dans les premières heures suivant l'inoculation de méningocoques sur des tissus nasopharyngés en culture, le méningocoque adhère sur les cellules non ciliées du tissu (Figure 1A) (Stephens *et al.*, 1983). Les bactéries se multiplient et forment alors des microcolonies compactes à la surface des cellules. Suite à cette adhésion, les microvilli épithéliaux au contact des bactéries s'allongent et entourent les microcolonies bactériennes. La formation de microcolonies à la surface des cellules nécessite une interaction bactérie/bactérie, ou agrégation, qui permet une cohésion bactérienne au sein de la microcolonie (Helaine *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2001 ; Voloshin and Kaprelyants, 2004). Contrairement aux microcolonies classiquement décrites chez d'autres espèces comme *Pseudomonas aeruginosa*, le méningocoque ne sécrète pas de matrice extracellulaire et aucun mécanisme de « Quorum Sensing » n'a été observé (Dove *et al.*, 2003; Wagner and Iglewski, 2008). Cette première étape précoce est appelée « adhésion localisée » (Figure 1B) (Pujol *et al.*, 1997; Pujol *et al.*, 1999).

Après une vingtaine d'heures, les bactéries recouvrent la surface cellulaire avec peu ou pas d'interaction entre elles. Cette adhésion diffuse est associée à une perte des microvilli épithéliaux autour des bactéries ainsi qu'à des dommages structuraux des cellules ciliées (perte de ciliation) et une augmentation de sécrétions de globules de mucus par les cellules sécrétrices (*goblet cells*). Les bactéries adhèrent alors à tous les types de cellules du tissu (Read *et al.*, 1995; Stephens *et al.*, 1983 ; Stephens *et al.*, 1986). Cette seconde étape a été baptisée « adhésion intime » (Figure 1C) (Pujol *et al.*, 1997; Pujol *et al.*, 1999).

b. Adhésion localisée

L'étape d'adhésion localisée est caractérisée par la formation de microcolonies compactes à la surface des cellules épithéliales (Figure 1B). Cette étape précoce d'adhésion dépend essentiellement de la présence des Pili de type IV (Pt4) (Nassif and So, 1995; Nassif *et al.*, 1997; Stephens and McGee, 1981). Ils permettent une adhésion efficace aux cellules et sont essentiels à l'agrégation bactérienne, donc à la formation de la microcolonie. La biogenèse et le rôle des Pt4 seront décrits en détail par la suite (voir chapitre I.B).

La transition avec l'étape d'adhésion intime a été attribuée à la régulation négative de l'expression des Pt4 et de la capsule après quelques heures au contact des cellules eucaryotes (Deghmane *et al.*, 2000; Deghmane *et al.*, 2002). En effet, la capsule polysaccharidique du méningocoque joue un rôle important dans les interactions entre bactéries et avec la cellule. La capsule ne forme pas une paroi infranchissable à la surface de la bactérie, c'est une structure labile. Cependant il a été montré que la présence de capsule réduisait sensiblement l'accessibilité des protéines membranaires (Hardy *et al.*, 2000; McNeil *et al.*, 1994 ; Stephens *et al.*, 1993 ; Virji *et al.*, 1993a). En présence de capsule, seuls les Pt4, appendices filamenteux exposés à la surface de la bactérie, semblent efficacement accessibles. Ils sont donc la structure principale assurant l'adhésion initiale. De plus, ils sont indispensables à la formation de la microcolonie.

c. Adhésion intime

Après quelques heures en contact avec des cellules, la quantité de Pt4 exposés à l'extérieur des bactéries diminue (Deghmane *et al.*, 2000; Deghmane *et al.*, 2002). En absence de Pt4, le méningocoque ne forme pas d'agrégats. Les microcolonies s'étalent donc sur la surface cellulaire (Figure 1C). Le méningocoque peut adhérer aux cellules par l'intermédiaire de plusieurs autres protéines exposées à sa surface. La plupart de ces protéines sont masquées par la capsule, leur participation à l'adhésion n'est significative qu'en absence de celle-ci, pendant l'adhésion intime. Les plus importantes de ces adhésines auxiliaires sont les protéines

d'opacité « Opa ». A l'heure actuelle, il est proposé que ces protéines prennent le relais des Pt4 pour l'adhésion pendant cette seconde phase de la colonisation (pour revue (Virji, 2009)).

i. Opa et Opc

Les protéines d'opacité, Opa et Opc, sont aussi appelées protéines de classe 5 ou P.II. Les protéines Opa sont des protéines membranaires, intégrées dans la membrane externe, codées par 3 ou 4 gènes selon les souches (*opaA*, *B*, *D* et *J* ou *C*). Elles présentent de fortes homologues de séquences entre elles en dehors des 3 régions variables exposées SV, HV1 et HV2 (de Jonge *et al.*, 2002). Un cinquième gène codant une protéine Opc (ou protéine C), qui présente de nombreuses similarités avec les Opa, est retrouvé uniquement dans certaines souches de méningocoque (Achtman *et al.*, 1988).

Les protéines d'opacité sont classées en deux groupes (pour revue (Hauck and Meyer, 2003): Les Opa-HS sont capables de lier certains résidus saccharidiques comme les sulfates d'héparane retrouvés sur les récepteurs cellulaires ubiquitaires HSPGs (*Heparansulfate proteoglycans*). Ces protéines peuvent aussi interagir directement avec des protéines de la matrice extracellulaire comme la Vitronectine et la Fibronectine. Dans cette catégorie, on retrouve la protéine OpaA (ou Opa50) du gonocoque et la protéine Opc du méningocoque (Swanson *et al.*, 2001; Virji *et al.*, 1993a ; Virji *et al.*, 1994). Ces protéines peuvent également lier les sucres à la surface d'une bactérie voisine permettant l'agrégation de quelques bactéries entre elles (Blake *et al.*, 1995).

Les Opa-CEA sont capables de se lier aux récepteurs de la famille CD66, où CEACAM (*Carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule*). Ces récepteurs sont spécifiques de tissus, ainsi l'adhésion de la bactérie dépendra des protéines Opa et des récepteurs CEACAM exprimés sur un type cellulaire (Billker *et al.*, 2002).

ii. Adhésines auxiliaires

Plusieurs autres molécules exposées à la surface du méningocoque ont été décrites comme participant à l'adhésion de la bactérie aux cellules de l'hôte. Cependant, elles sont généralement moins efficaces que les Pt4 ou les Opa et leur fonction exacte n'est pas toujours connue. On retrouve ainsi le système de sécrétion à deux partenaires HrpA(TspA)/HrpB qui participe à l'adhésion sur cellules épithéliales ainsi que à la formation de biofilm (Neil and Apicella, 2009; Oldfield *et al.*, 2007; Schmitt *et al.*, 2007; Tala *et al.*, 2008). La protéine

NadA (*Neisserial adhesine A*) est retrouvée en particulier dans les souches hypervirulentes de méningocoque (Capecchi *et al.*, 2005; Comanducci *et al.*, 2002). Les porines PorB, protéines capables de créer un pore dans la membrane externe, se lient à la glycoprotéine Gp96 permettant l'adhésion aux cellules hôtes via l'interaction entre Gp96 et le récepteur cellulaire SREC (*Scavenger receptor expressed in endothelial cells*) (Bauer *et al.*, 1999 ; Rechner *et al.*, 2007). PorB est également un ligand du TLR2 (*Toll like receptor 2*) (Massari *et al.*, 2006). Enfin, il existe trois autotransporteurs, de la famille de la protéine Hap de *Haemophilus influenzae*, décrits comme participant à l'adhésion sur cellules épithéliales : NhhA (*Neisseria hia/hsf homologue A*), App (*Adhesion and penetration protein*) et MspA (*Meningococcal serine protease A*) (Hadi *et al.*, 2001 ; Scarselli *et al.*, 2006; Serruto *et al.*, 2003; Sjolinder *et al.*, 2008; Turner *et al.*, 2006).

iii. Le lipooligosaccharide

Le lipooligosaccharide (LOS) participe à l'adhésion du méningocoque en établissant des interactions non spécifiques avec la membrane plasmique de la cellule hôte. La composition en sucre du LOS influence la qualité de ces interactions (Plant *et al.*, 2006). Il a également été décrit que certains immunotypes de LOS chez *N. gonorrhoeae* sont capables de se lier aux récepteurs aux asialo-glycoprotéines présents sur les hépatocytes et dans le sperme humain (Harvey *et al.*, 2000; Porat *et al.*, 1995). Cette adhésion spécifique a un intérêt certain dans l'étude du cycle de vie du gonocoque mais ne semble pas pertinente en ce qui concerne le méningocoque.

2. Survie et croissance

Dans son environnement naturel, le méningocoque est en contact avec les autres bactéries commensales locales et avec les cellules de l'hôte. Les différentes cellules entrent alors en compétition pour l'espace et la nutrition. Des systèmes de captation des nutriments compétitifs sont donc présents chez ces bactéries. Chez les *Neisseria*, ces systèmes ont été très peu étudiés à l'exception des systèmes de captation du fer.

Le fer est un élément vital pour une cellule, il est présent en très faible quantité et généralement couplé à des sidérophores de l'hôte. Les deux stratégies mises en place par les

bactéries commensales pour capter le fer, consistent soit à sécréter un sidérophore plus affin que ceux de l'hôte, soit à détourner les sidérophores de l'hôte pour leur propre profit.

Le méningocoque a développé plusieurs systèmes de captation du fer basés sur l'affinité de récepteurs membranaires à quelques sidérophores humains, en particulier la lactoferrine, la transferrine et l'hémoglobine (pour revues (Perkins-Balding *et al.*, 2004; Schryvers and Stojiljkovic, 1999).

3. Modifications génétiques et morphologiques des cellules hôtes

Durant ces étapes de colonisation, un « dialogue » s'établit entre les bactéries et la cellule hôte ; la présence des bactéries module le comportement de la cellule hôte et *vice versa*.

L'adhésion du méningocoque déclenche une modification du profil d'expression des gènes des cellules épithéliales ou endothéliales (Howie *et al.*, 2005; Linhartova *et al.*, 2006; Plant *et al.*, 2004). Le rôle de ce phénomène n'est pas encore totalement élucidé mais il est proposé que cela participe à la survie de la cellule hôte, notamment en supprimant l'expression de gènes pro-apoptotiques induite par la présence de la bactérie.

En parallèle, le méningocoque déclenche des voies de signalisation calciques et une réorganisation du cytosquelette d'actine et de la surface membranaire. Ces événements seront détaillés par la suite (voir chapitres I.B.III et I.C).

4. Modifications génétiques et morphologiques des bactéries

Au contact de cellules humaines, le méningocoque voit également son profil d'expression génique changer. Deux études indépendantes, à l'échelle du génome entier, ont montré que l'expression de plusieurs dizaine de gènes (72 ou 347) était modifiée après un contact avec des cellules épithéliales (Dietrich *et al.*, 2003; Grifantini *et al.*, 2002). Parmi ces gènes, plusieurs codent des protéines de surface.

D'autres études se sont intéressées à certains gènes en particulier. La bactérie possède une séquence opérateur Rep2 (ou CREN; *Contact regulatory elements of Neisseria*) en amont de 14 gènes (Morelle *et al.*, 2003). L'adhésion aux cellules hôtes déclenche une surexpression transitoire de ces gènes. Il a été récemment décrit que cette induction nécessite la présence d'un système de transduction du signal à deux composants du méningocoque (Jamet *et al.*, 2009). Parmi ces gènes, on retrouve le gène codant la protéine PilC1 du système de synthèse des Pt4. Cette protéine essentielle à l'adhésion de la bactérie sera décrite par la suite (voir chapitre I.B.II.7). On retrouve également le gène codant le facteur de transcription *crgA* ; la production de CrgA induit une répression de l'expression des gènes *pilE*, qui code la sous-unité majoritaire des Pt4, et le gène *siaD*, qui code une enzyme essentielle à la synthèse de la capsule (Deghmane *et al.*, 2000; Deghmane *et al.*, 2002). Cette répression provoquerait la diminution de la quantité de pili et de capsule à la surface du méningocoque (Pujol *et al.*, 1997). Il s'agit du mécanisme moléculaire dont on suppose qu'il permet la transition entre l'adhésion localisée et l'adhésion intime.

5. *Echappement au système immunitaire*

a. *Colonisation de la muqueuse*

Les défenses naturelles dans le nasopharynx impliquent plusieurs mécanismes. En premier lieu, il existe une barrière physique et mécanique non spécifique constituée de l'épithélium et du flux de mucus. Ensuite la population microbienne commensale concourt à la colonisation contre les bactéries pathogènes. Cela limite la possibilité pour ces bactéries de coloniser cette niche. Enfin, l'immunité mucoale est basée sur la présence de plusieurs systèmes, notamment, le système du complément (Figure 2) (pour revue (Emonts *et al.*, 2003), les immunoglobulines A (IgA) sécrétées et des peptides antibactériens souvent sécrétés suite à la reconnaissance d'antigènes bactériens par les récepteurs TLR (*Toll like receptor*).

D'une manière générale, ces systèmes sont activés lors de la reconnaissance de molécules bactériennes par l'hôte. La reconnaissance de ces antigènes induit une réponse inflammatoire locale, permettant le recrutement de cellules phagocytaires, ainsi que la formation d'un

complexe de lyse membranaire par le complément (MAC; *Membrane attack complex*) et la sécrétion de peptides antimicrobiens comme les β -défensines par les cellules épithéliales.

La reconnaissance d'antigènes microbiens est donc la clef de voûte de cette réponse immune de l'hôte. Elle peut être spécifique, c'est le cas des IgA ou des voie classique et voie des lectines du système du complément. Cependant il existe une défense immunitaire non spécifique du microbe. Cette réponse implique la reconnaissance d'antigènes bactériens ubiquitaires (LPS, flagelline, ADN, sucres, etc.) par certains TLR ou par la protéine C3 dans la voie alterne du complément.

b. Fluidité des génomes des Neisseria

Comme pour d'autres bactéries commensales, le principal mécanisme d'échappement au système immunitaire de *N. meningitidis* repose sur la modulation des antigènes de surface (pour revues (Davidsen and Tonjum, 2006; van der Woude and Baumler, 2004). En ce qui concerne le méningocoque, cette modulation est assurée par deux mécanismes principaux : la variation de phase et la variation allélique.

i. Variation de phase

La variation de phase est un mécanisme décrit chez plusieurs espèces bactériennes commensales ou pathogènes ; elle agit sur des régions de l'ADN hautement mutatrices situées dans un gène et a pour effet, en cas de mutation, de moduler l'expression du gène. Ces mutations concernent en moyenne 1% de la population bactérienne. Chez *N. meningitidis*, il existe 65 gènes probablement soumis à la variation de phase dont 24 codent des protéines de surface ou sécrétées ou encore des enzymes de biosynthèse de polysaccharides de surface (Martin *et al.*, 2003; Saunders *et al.*, 2000). Dans une population de méningocoque, ces gènes ne seront pas exprimés de la même manière selon les bactéries. Le méningocoque est une bactérie à population panmictique, il n'existe pas de « clones » au sens classique dans cette espèce bactérienne.

Dans le cas des *Neisseria*, deux mécanismes moléculaires ont été décrits. Le premier consiste en des répétitions de simple nucléotide pouvant varier en longueur. Ces variations de longueur sont probablement dues au glissement de la polymérase pendant la réplication du génome. Ces mutations sont reconnues et corrigées par le système « mismatch repair »

puisque des mutations dans les gènes *mutS* et *mutL* augmentent la fréquence de mutations observées (Martin *et al.*, 2004; Richardson and Stojiljkovic, 2001). Le second consiste en séquences répétées en tandem de tétra- ou penta-nucléotides. Il est proposé que le nombre de répétitions peut varier suite à des mésappariement des brins d'ADN pendant la réplication du génome (Bayliss *et al.*, 2002 ; Martin *et al.*, 2005).

Ces séquences répétées se situent généralement dans la séquence codante d'un gène ; un allongement ou raccourcissement de la séquence peut décaler le cadre de lecture du gène et aboutir à la traduction d'une protéine tronquée et/ou non fonctionnelle. Ce mécanisme, appelé « on/off », est réversible et une simple mutation aboutit à l'absence ou à la présence de la protéine fonctionnelle. Les séquences répétées sont parfois retrouvées dans les séquences régulatrices d'un gène ; un décalage dans l'alignement des séquences régulatrices peut alors affecter le niveau de transcription du gène (Martin *et al.*, 2005).

La variation de phase est parfois associée à la duplication de gène qui permet la coexistence de plusieurs copies paralogues d'un même gène au sein du génome. Cela permet d'exprimer l'un ou l'autre des paralogues ou des combinaisons particulières. C'est le cas par exemple des gènes *opa*, répartis sur 4 *loci* chez le méningocoque (*opaA*, *opaB*, *opaD* et *opaJ*), tous soumis à variation de phase (Callaghan *et al.*, 2006; Hobbs *et al.*, 1994). Ainsi, une souche de *N. meningitidis* peut exprimer différentes combinaisons de protéines Opa ou aucune.

Ce mécanisme, sélectionné au cours de l'évolution, permettrait d'augmenter la fitness des bactéries en optimisant l'échappement au système immunitaire (pour revue (Moxon *et al.*, 1994).

ii. Variation allélique

La variation allélique est basée sur la compétence naturelle pour la transformation qui dépend des Pt4 et sur la recombinaison homologue dépendant des voies RecF (pour revue (Fussenegger *et al.*, 1997). Il est proposé que l'ADN exogène se lie aux Pt4 par des interactions électrostatiques ; la rétraction des Pt4 permettrait alors l'entrée de l'ADN dans le périplasme (Craig *et al.*, 2006). Dans le périplasme, l'ADN est pris en charge et transporté jusqu'au cytoplasme par une machinerie complexe dépendant des protéines « Com ». Il est ensuite incorporé dans le génome par recombinaison homologue. Ce système permet aux bactéries d'échanger les allèles de certains gènes.

Un mécanisme particulier de conversion génique, indépendant de la transformation de la bactérie par de l'ADN exogène, a été décrit pour le gène *pilE*. Ce gène code la séquence de la protéine PilE, sous unité majoritaire des Pt4 (voir chapitre I.B.II.1). Il existe plusieurs copies incomplètes du gène *pilE* dans le génome des *Neisseria* sous forme de pseudogènes nommés *pilS*. Ces pseudogènes peuvent recombiner avec le gène *pilE* grâce à un mécanisme de conversion génique dépendant de RecA (Kline *et al.*, 2007; Koomey *et al.*, 1987). Ce mécanisme, nommé « variation antigénique » crée une variation allélique pour *pilE* au sein d'une même population.

Le gène *pilE* peut également recombiner de façon plus classique avec de l'ADN exogène.

c. Variation des antigènes de surface

Ces mécanismes de variation génétique touchent en particulier les molécules de surface du méningocoque. Le système immunitaire est basé en partie sur la reconnaissance spécifique de ces antigènes et exerce probablement une pression de sélection forte sur ces structures. La modulation de ces antigènes permet d'éviter l'immunisation de l'hôte contre la population bactérienne dans son ensemble. Pour exemple, deux des principales structures à la surface du méningocoque sont : la capsule et le LOS (Figure 3).

i. La capsule

N. meningitidis possède une capsule polysaccharidique dont la synthèse est assurée en particulier par les gènes *sia* (Yazdankhah *et al.*, 2004). La capsule est un polymère de sucres généralement acides, parfois acétylés, ancré à la membrane externe par un phospholipide. Il existe 13 sérotypes capsulaires décrits parmi les souches de portage (A, B, C, D, 29E, H, I, K, L, W135, X, Y et Z). Plusieurs gènes codant les enzymes de biosynthèse de la capsule sont soumis à la variation allélique. Cela permet à une souche de changer de type capsulaire et donc de modifier ses antigènes de surface (Ala'Aldeen *et al.*, 2000). Le gène *siaD* code une enzyme responsable de l'assemblage de la capsule dans le cytoplasme ; ce gène est soumis à variation de phase. Il existe donc naturellement des souches de portage non capsulées (Claus *et al.*, 2002; Hammerschmidt *et al.*, 1996).

La diversité des types capsulaires empêche l'effet immunoprotecteur dû au portage (Yazdankhah and Caugant, 2004). L'acide sialique porté par certains sérotypes est également

un antigène naturel de surface humain ; il est protecteur pour la bactérie, notamment, il empêche la reconnaissance par la protéine C3 dans la voie alterne du complément (Figure 2) (Kahler *et al.*, 1998; Schneider *et al.*, 2007). Cette diversité empêche aussi l'opsonisation de la bactérie et donc sa phagocytose (Unkmeir *et al.*, 2002a).

ii. *Le lipooligosaccharide*

Le LOS est un oligosaccharide ancré à un lipide A de la membrane externe par deux acides KDO (*3-deoxy-D-mannose-2-octulosonic acid*) (Figure 3). Il correspond au LPS, très abondant à la surface des bactéries à Gram négatif, et doit son nom à une séquence osidique courte. Il existe 12 immunotypes différents selon les sucres terminaux du LOS (L1 à L12). Deux des gènes codant les enzymes de biosynthèse du LOS, *lgtA* et *lgtG*, sont soumis à la variation de phase. Il existe donc des souches exprimant des formes tronquées du LOS augmentant encore la variabilité (Saunders *et al.*, 2000). Enfin, certains immunotypes (L3, L7, L9) peuvent être sialilés grâce au produit du gène *lst* (Pavliak *et al.*, 1993).

Comme pour la capsule, la diversité de structure du LOS permet d'échapper à la reconnaissance par système immunitaire. De plus, le LOS participe à la résistance au complément en empêchant la reconnaissance de la bactérie par la protéine C3 du complément (Figure 2) (Kahler *et al.*, 1998; Schneider *et al.*, 2007; Unkmeir *et al.*, 2002a).

d. *Autres mécanismes d'échappement au système immunitaire*

i. *Protection et régulation du complément*

Outre les effets déjà cités, la capsule assure une résistance à la lyse bactérienne notamment en gênant l'insertion du complexe d'attaque MAC du complément dans la membrane (Figure 2). La protéine membranaire PorA est capable de lier la protéine C4bpG qui participe à la régulation négative de la voie classique. Il existe également une autre protéine membranaire, codée par le gène *fHbp* (*factor H binding protein*), capable de lier le facteur H qui régule la protéine C3 dans la voie alterne. Cette protéine pourrait participer ainsi à l'inhibition du complément (Ram *et al.*, 2001; Schneider *et al.*, 2007; Schneider *et al.*, 2009). Le LOS et la capsule permettent également d'échapper au système immunitaire en participant à la résistance aux peptides antimicrobiens, comme LL-37, qui peuvent être sécrétés après activation du complément (Jones *et al.*, 2009).

ii. *Dégradation des IgA circulatoires*

En parallèle, les *Neisseria* pathogènes sécrètent une protéase capable de cliver les IgA1 en deux fragments distincts Fc et Fab. Cette protéase est un autotransporteur, sécrétée par autoprotéolyse. Le domaine carboxy-terminal s'ancore dans la membrane externe formant un pore par lequel le domaine protéolytique va être sécrété dans le milieu (pour revue (Klauser *et al.*, 1993) (Vitovski and Sayers, 2007). Il est proposé que ce système permet de bloquer la réponse immunitaire dépendant des IgA1 dans le mucus.

iii. *Internalisation*

Neisseria meningitidis et *N. gonorrhoeae* sont capables de s'internaliser dans les cellules épithéliales (Read *et al.*, 1995; Stephens *et al.*, 1983). Cette internalisation nécessite principalement les protéines Opa, bien que d'autres facteurs bactériens semblent impliqués comme le LOS et d'autres protéines de surface telles NadA (Capecchi *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1998). Dans le cas des Opa-CEA, le mécanisme d'internalisation dépend du récepteur CEACAM exprimé sur le type cellulaire. La liaison aux récepteurs CEACAM 3 déclenche une internalisation de la bactérie qui dépend du cytosquelette d'actine et de l'activation des petites GTPases Rac1 et Cdc42 (Billker *et al.*, 2002). Cette internalisation évoque une phagocytose induite par la bactérie (Grassme *et al.*, 1996; Shaw and Falkow, 1988; Wang *et al.*, 2008). Il a cependant été montré que l'internalisation dépendante des récepteurs CEACAM 1 et 6, ne dépend pas du cytosquelette d'actine (Billker *et al.*, 2002). Il existe donc plusieurs mécanismes indépendants. Dans le cas des Opa-HS, l'internalisation des bactéries semble nécessiter l'interaction entre les protéines et les molécules de la matrice extracellulaire (Virji *et al.*, 1993a ; Virji *et al.*, 1994).

La plupart des molécules permettant l'internalisation sont des molécules de surface. Cela implique que la présence de la capsule, qui masque ces protéines, réduit l'efficacité du phénomène. De plus, ces molécules sont souvent soumises à la variation de phase. Elles ne sont donc pas présentes à la surface de toute la population bactérienne (McNeil *et al.*, 1994). Ces caractéristiques expliquent en partie pourquoi l'internalisation ne concerne qu'une fraction réduite de la population. Elles suggèrent également que l'internalisation se produirait de manière plus efficace pendant l'adhésion intime (Read *et al.*, 1995). Les bactéries sont internalisées transitoirement dans des vésicules d'endocytose avant de sortir de la cellule par un mécanisme non encore élucidé (Figure 1C) (Criss and Seifert, 2006). Il a été proposé que

ce phénomène participe à la survie puisque les bactéries internalisées ne sont plus exposées au système immunitaire extracellulaire.

6. *Transmission de la bactérie*

La transmission des bactéries nécessite que celles-ci se décrochent de la surface des cellules hôtes. Le seul mécanisme postulé à ce jour est la perte de pili pendant la transition entre l'adhésion localisée et l'adhésion intime (Pujol *et al.*, 1997). La perte de pili est associée à une perte d'agrégation. Les bactéries, qui ne sont pas en contact intime avec la membrane plasmique, se décrocheraient de la colonie puis coloniseraient un nouveau site. La transmission entre individus se fait par voie aérienne, par exemple lors d'éternuements ou d'expectorations.

Tous les attributs moléculaires décrits dans ce premier chapitre ont été sélectionnés au cours de l'évolution pour permettre aux *Neisseria* de survivre dans leurs environnements naturels. Cependant, dans le cas de *N. meningitidis*, la bactérie est capable de franchir l'épithélium nasopharyngé, de se répandre et se multiplier dans le sang provoquant des septicémies puis des méningites souvent fatales. Durant la pathogenèse, les mêmes attributs moléculaires sont impliqués dans la survie et la dissémination de la bactérie.

Les infections invasives à méningocoque sont intrigantes. En effet, aucun mécanisme de transmission n'a été découvert à ce jour après le franchissement de la barrière nasopharyngée. Une fois entré dans cette voie pathogène, le méningocoque a donc probablement deux avenir possibles : être détruit par le système immunitaire ou tuer son hôte. Par conséquent, ce cycle infectieux peut être considéré comme une impasse évolutive pour la bactérie (Taha *et al.*, 2002). Cela signifie que les mécanismes moléculaires par lesquels le méningocoque déclenche la maladie n'ont pas été sélectionnés au cours de l'évolution dans ce sens.

II. La voie pathogène

Le méningocoque est l'agent étiologique de la méningite cérébrospinale. Chez l'Homme, plus de 80% des méningites bactériennes sont le fait de trois pathogènes : *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* et *N. meningitidis*. Depuis l'introduction dans les années 90 d'un vaccin conjugué contre *H. influenzae* et depuis quelques années d'un vaccin contre *S. pneumoniae*, le méningocoque devient l'agent majeur responsable des méningites bactériennes. Ces infections à méningocoque (septicémies et méningites) touchent particulièrement les jeunes adultes (15 à 20 ans) et les jeunes enfants (<1an) chez lesquels l'incidence de la maladie peut atteindre respectivement 5 et 20 cas pour 100.000 habitants, au lieu de 1 à 2 cas dans la population (Parent du Châtelet *et al.*, 2007). Ces infections touchent près de 500.000 personnes par an à travers le monde en dehors des événements épidémiques et restent mortelles dans 10% des cas en moyenne (source OMS). Les septicémies peuvent également conduire à l'amputation des membres et les méningites sont régulièrement la cause de séquelles neurologiques. Bien qu'étant un commensal de l'espèce, le méningocoque est également un pathogène extrêmement dangereux pour l'Homme.

L'infection suit le schéma suivant (Figure 4) : la bactérie franchit l'épithélium nasopharyngé et rejoint le sang. Ce milieu riche permet une croissance rapide entraînant une bactériémie élevée et parfois un choc septique qui peut être fatal. Dans le sang, le méningocoque est capable d'adhérer à l'endothélium vasculaire (Mairey *et al.*, 2006; Pathan *et al.*, 2003). Cette colonisation entraîne une altération des vaisseaux provoquant l'une des manifestations cliniques les plus connues des infections invasives à méningocoque : le *purpura fulminans*. Ce *purpura fulminans* correspond à une hémorragie locale, associée à la nécrose des capillaires sanguins cutanés. De tels événements ont également lieu au niveau des capillaires sanguins dans la plupart des organes : reins et glandes surrénales, poumons voire cœur, provoquant de nombreuses complications dont un effondrement du système circulatoire (Emonts *et al.*, 2003). Au niveau de la barrière hémato-encéphalique (BHE), les événements sont encore mal compris. Cette barrière cellulaire est réputée être l'une des plus imperméables du corps humain. Elle est composée de l'épithélium choroïdal et d'un endothélium structurellement différent de l'endothélium sanguin. Le méningocoque est capable de franchir

cette barrière cellulaire et de rejoindre le liquide céphalorachidien (LCR), d'y survivre et de s'y multiplier. La présence de bactéries dans cet environnement déclenche l'inflammation caractéristique de la méningite (pour revues (Pathan *et al.*, 2003 ; Tunkel and Scheld, 1993).

1. Franchissement de l'épithélium

La première étape de la pathogenèse consiste à franchir l'épithélium nasopharyngé. Deux hypothèses dominant pour le passage à travers cet épithélium.

La première hypothèse, basée sur la capacité de la bactérie à s'internaliser, suggère un passage au travers de la cellule hôte, par transcytose. Les bactéries traverseraient l'épithélium en franchissant la membrane plasmique apicale, le cytoplasme et enfin la membrane plasmique basale des cellules épithéliales. Plusieurs arguments soutiennent cette hypothèse, en particulier des expériences d'infection de monocouches de cellules épithéliales polarisées. Après plusieurs heures d'infection, un traitement à la gentamicine tue les bactéries extracellulaires. Quelques heures plus tard, des bactéries sont retrouvées dans le milieu extérieur de chaque côté de la monocouche de cellules (Criss and Seifert, 2006). Dans les cas décrits, cette transcytose nécessite le cytosquelette d'actine et les microtubules ainsi que les moteurs moléculaires : Myosine, Dynéine et Kinesine (Grassme *et al.*, 1996 ; Wang *et al.*, 2008). Le franchissement nécessite donc les mêmes molécules que l'internalisation. La capsule gêne ce phénomène puisque celle-ci masque les protéines membranaires (McNeil *et al.*, 1994).

La seconde hypothèse implique une altération des muqueuses par l'environnement. La muqueuse peut-être irritée ou détériorée par des phénomènes extérieurs ou par d'autres pathogènes, ouvrant un accès direct à travers l'épithélium. Ainsi les épidémies de méningites en Afrique font suites à un vent de sable sec, l'Harmattan, connu pour irriter les muqueuses respiratoires (Roberts, 2008).

Au niveau des cellules épithéliales, un passage par voie paracellulaire en franchissant l'épithélium entre les cellules n'a jamais été décrit. Ce phénomène n'a jamais été observé *in vitro* et l'intégrité des jonctions serrées entre les cellules semble maintenue tout au long de l'infection (Pujol *et al.*, 1997).

2. Croissance et survie dans le sang

Après avoir franchi la première barrière cellulaire, le méningocoque rejoint la circulation sanguine. La réponse immunitaire dans le sang ressemble pour l'essentiel à celle du nasopharynx à laquelle s'ajoute de nombreuses cellules immunitaires circulantes comme les leucocytes. Les mécanismes de modulation des antigènes de surface décrits précédemment jouent un rôle prépondérant dans la survie de la bactérie dans ce milieu.

a. Résistance au complément

Il a été décrit une susceptibilité importante aux infections invasives à méningocoque chez certains patients présentant des maladies génétiques touchant les protéines du système du complément (pour revue (Emonts *et al.*, 2003). Ce système semble donc très important dans la lutte contre ce pathogène. Les deux facteurs essentiels de la résistance au complément dans le sang sont la capsule et le LOS (Geoffroy *et al.*, 2003; Mackinnon *et al.*, 1993). *In vitro*, l'absence de capsule ou de LOS rend les bactéries sensibles à la présence de complément dans le sérum. *In vivo*, la capsule semble indispensable à la survie dans le sang puisque pratiquement aucune souche non capsulée n'a été isolée de patients (Findlow *et al.*, 2007; Geoffroy *et al.*, 2003).

Ces premières étapes mettent en lumière un paradoxe. Le franchissement de l'épithélium par transcytose nécessite une réduction de la quantité de capsule alors que celle-ci semble indispensable dans le sang. La régulation de la présence de la capsule doit être très dynamique pour permettre cette régulation rapide de la présence de la capsule.

b. Autres mécanismes

La résistance au complément et à la phagocytose ne sont évidemment pas les seuls éléments indispensables à la survie et à la multiplication de la bactérie dans le sang. L'utilisation d'un modèle de rat nouveau né a montré qu'au moins 73 gènes bactériens sont impliqués dans la bactériémie (Sun *et al.*, 2000). On retrouve ainsi les gènes codant les

enzymes responsables de la synthèse de la capsule et du LOS mais également les systèmes de captation du fer, certains transporteurs, des voies métaboliques incluant la synthèse des acides aminés et de protéine. Une étude épidémiologique récente montre que le récepteur à l'hémoglobine semble effectivement essentiel pour les souches responsables d'infections invasives à méningocoque. Celui-ci est présent dans près de 95% de ces souches contre moins de 80% dans la population de portage testée (Harrison *et al.*, 2009). Le génome du méningocoque code également une NO reductase, *norB*, impliquée dans la résistance aux dérivés nitriques produits par les macrophages (Stevanin *et al.*, 2007).

La survie et la multiplication de la bactérie dans le sang peuvent déclencher un choc septique. Le LOS est l'endotoxine principale du méningocoque. Dans le sang, lorsque la bactériémie devient trop élevée, il est responsable d'une réponse inflammatoire non régulée (Dunn *et al.*, 1995). Il a notamment été montré que le LOS, s'il n'est pas sialilé, provoque la sécrétion de cytokines et chemokines inflammatoires (TNF- α , IL8, IL1 β , IL6, etc.) chez la souris et l'Homme (Kurzai *et al.*, 2005; Zarantonelli *et al.*, 2006).

3. Colonisation de l'endothélium sanguin

Dans la circulation sanguine, la bactérie est capable d'adhérer à l'endothélium vasculaire. Le méningocoque adhère uniquement sur les cellules humaines, évoquant un récepteur spécifique d'espèce, mais peut adhérer indifféremment sur plusieurs types cellulaires *in vitro*, dont les cellules endothéliales sanguines (Stephens, 1989). Cette adhésion a lieu spécifiquement au niveau des capillaires sanguins, en particulier au niveau des capillaires cérébraux (Mairey *et al.*, 2006; Pathan *et al.*, 2003). La colonisation des vaisseaux est à l'origine du *purpura fulminans*.

Dans le sang, la présence de la capsule étant indispensable, les Pt4 seront les principales molécules responsables de cette colonisation. La colonisation dépendante des pili est traitée en détail dans la suite (voir chapitre I.B). Aucune description d'une étape d'adhésion intime n'a été faite à ce jour au niveau de l'endothélium sanguin. Cela suggère que cette phase secondaire de la colonisation n'a peut-être pas lieu dans le contexte sanguin.

4. Franchissement de la barrière hémato-encéphalique

La BHE, barrière cellulaire qui sépare le système nerveux central de la circulation sanguine, est composée de l'endothélium cérébral sanguin et, au niveau des ventricules, de l'épithélium des plexus choroïdes (Figure 5). L'endothélium cérébral diffère des autres endothéliums sanguins : les cellules endothéliales sont reliées entre elles par des jonctions serrées (*zona occludens*), des astrocytes et parfois des cellules musculaires lisses (les pericytes) enserrant ces vaisseaux (Abbott *et al.*, 2006). Cet endothélium est sélectif aux ions et métabolites. Les plexus choroïdes sont le lieu des échanges de molécules entre le système nerveux central et le sang. Ils sont composés d'un épithélium choroïdal, qui sécrète le LCR, relié par des jonctions serrées et reposant sur une membrane basale. Ces caractéristiques particulières font que la BHE est considérée comme la barrière la plus imperméable du corps humain.

Peu de pathogènes sont capables de traverser la BHE. En général, le franchissement de la BHE par un pathogène est lié à une détérioration non spécifique de la barrière suite à l'inflammation durant un choc septique. Dans le cas du méningocoque, le franchissement semble plus spécifique puisque des cas de méningites sans septicémies détectables, par conséquent sans inflammations détectables, sont souvent signalées (pour revues (Nassif *et al.*, 2002; Tunkel and Scheld, 1993).

Le méningocoque est capable d'adhérer sur les deux structures, endothélium sanguin et plexus choroïde. Cette adhésion semble être une condition préalable au franchissement de la BHE (Pron *et al.*, 1997 ; Pujol *et al.*, 1997).

Le mécanisme de franchissement de la BHE n'a pas encore été décrypté. Il est proposé que, comme pour la barrière nasopharyngée, le méningocoque franchisse la BHE par transcytose, par les mêmes mécanismes moléculaires. Ce point est controversé, en effet, *in vitro*, la bactérie est capable de s'internaliser dans des cellules endothéliales mais cette observation n'est pas unanime pour ce qui concerne les cellules endothéliales cérébrales (Hardy *et al.*, 2000 ; Unkmeir *et al.*, 2002b). Ensuite, l'internalisation est un phénomène mineur au niveau de la gorge et est fortement favorisée par l'absence de capsule. L'absence de capsule est délétère pour la bactérie dans le contexte sanguin. Quoiqu'il en soit, selon cette hypothèse, la bactérie doit traverser au moins deux couches successives de cellules au niveau des capillaires

sanguins. Cela suggère une probabilité plus forte que le passage ait lieu au niveau des plexus choroïdes.

Une autre hypothèse suggère que la bactérie pourrait traverser la BHE entre les cellules, peut-être en déstabilisant les jonctions serrées. L'un des arguments est basé sur des observations histologiques de tissus cérébraux de patient après une méningite fatale montrant une rupture de vaisseaux sanguins et la fuite de bactéries dans les méninges (Mairey *et al.*, 2006). Cependant aucune évidence moléculaire n'a appuyé cette hypothèse jusqu'ici.

Dans le LCR, le système immunitaire est représenté par des immunoglobulines et le système du complément. Cependant, ce système est très faiblement présent. Cela permet à *N. meningitidis* de se multiplier rapidement. La présence des bactéries, dans cet environnement déclenche une réaction inflammatoire. Cette réaction induit une altération des capillaires cérébraux sanguins, et augmente la perméabilité de la BHE, conduisant à une augmentation de la pression intracrânienne. En parallèle, l'inflammation peut directement ou indirectement, via le recrutement de leucocytes, altérer les cellules neuronales, provoquant des séquelles neurologiques (pour revues (Pathan *et al.*, 2003; Tunkel and Scheld, 1993).

III. Transition commensal-pathogène

Pourquoi un commensal devient-il pathogène pour son hôte ? Parmi les *Neisseria*, deux espèces seulement sont responsables de pathologies chez l'Homme. Contrairement à *N. meningitidis*, pour *N. gonorrhoeae*, la pathologie semble faire partie du cycle de vie de la bactérie. Son portage peut-être associé à des inflammations des appareils reproductif et urinaire chez la femme mais est le plus souvent asymptomatique. Chez l'homme, il est responsable de la blennorragie ; la bactérie déclenche une inflammation de l'urètre avec sécrétions purulentes. Ce passage chez l'homme participe à la transmission de la bactérie. Le cas est différent pour le méningocoque puisque ce pathogène est responsable d'épidémies importantes, suggérant peut-être un lien inconnu entre la pathologie et la transmission (Taha *et al.*, 2002).

Il existe plusieurs explications à la capacité du méningocoque à devenir pathogène pour son hôte : des facteurs environnementaux, la susceptibilité de l'hôte et l'existence de souches virulentes.

1. Facteurs environnementaux

Le taux de portage varie en fonction de plusieurs facteurs environnementaux. Par exemple, le portage de 10% en moyenne dans la population peut atteindre 50% dans certains environnements où la proximité des individus est importante, comme les écoles ou les casernes militaires.

Les conditions de vie et l'âge influencent le taux de portage (métier, activités sociales, santé, etc.) (Cartwright *et al.*, 1987 ; Caugant *et al.*, 1994). Enfin les fumeurs sont également plus fréquemment porteurs de la bactérie (Stuart *et al.*, 1989). L'explication proposée est que la fumée de cigarette et certains métiers sont responsables d'altérations du système respiratoire, en particulier le système immunitaire peut-être compromis localement et on peut observer une diminution de la fonctionnalité des cellules ciliées responsables du flux de mucus. Cette altération du flux de mucus pourrait favoriser la colonisation de la muqueuse par le méningocoque comme il sera expliqué dans la suite (voir chapitre I.D.III.2) (Mairey *et al.*, 2006).

Un taux de portage important augmente proportionnellement le risque de déclencher la maladie.

2. Susceptibilité de l'hôte

Il a été montré une augmentation de l'incidence des infections invasives à méningocoque après des épidémies de grippe (Cartwright *et al.*, 1991 ; Griffiths *et al.*, 2007; Read *et al.*, 1999). L'hypothèse proposée pour expliquer ce fait est que la grippe affaiblit le système immunitaire qui ne peut alors plus lutter contre l'infection à méningocoque. Il a également été montré qu'une neuraminidase du virus de la grippe (*Influenza A H1N1*) pouvait augmenter l'adhésion de certains sérotypes capsulaires pouvant favoriser la colonisation

(Rameix-Welti *et al.*, 2009). Comme il a été précisé précédemment, des maladies génétiques touchant le système immunitaire favorisent la pathologie. Ainsi des maladies génétiques touchant les TLR4 ou certaines protéines du système du complément (lectines, C3, et facteurs régulateurs) sont associées à une augmentation de la fréquence et de la gravité des pathologies provoquées par le méningocoque (pour revue (Emonts *et al.*, 2003).

Les infections invasives à méningocoque touchent particulièrement les jeunes enfants (<1 an). Ce pic d'incidence correspond à l'âge où le système immunitaire de l'enfant prend le relais des anticorps maternels. Ce système immunitaire est naïf et donc susceptible aux infections microbiennes.

Ces différents exemples démontrent le rôle prépondérant du système immunitaire dans la régulation de ces infections à méningocoque.

3. Virulence de la bactérie

Toutes les souches de *N. meningitidis* ne sont pas responsables de méningites. Il existe 13 sérogroupes capsulaires, pourtant 90% des méningites sont provoquées par les sérogroupes A, B, et C. Les autres sont essentiellement le fait des sérogroupes W135, X et Y (Leimkugel *et al.*, 2007; Yazdankhah *et al.*, 2004). La capacité de ces souches à provoquer la maladie est en partie liée aux propriétés variables des différents types capsulaires pour échapper au système immunitaire (Kahler *et al.*, 1998; Unkmeir *et al.*, 2002a). En particulier, le séro groupe B est caractérisé par une capsule formée d'un polymère d'acide sialique. Cet acide sialique est très peu immunogène.

De même, certains immunotypes du LOS sont plus virulents, notamment L3, L7 et L9 qui peuvent être sialilés (Kahler *et al.*, 1998; Pavliak *et al.*, 1993).

La variabilité génétique du méningocoque permet une expression combinatoire des facteurs de virulences de la bactérie. Ainsi certaines combinaisons de molécules vont être plus efficaces pour provoquer la maladie soit en permettant l'expression de certaines adhésines, soit en permettant un meilleur échappement au système immunitaire (type capsulaire, LOS, Pt4, Opa, NadA, etc.).

Le typage MLST (Maiden *et al.*, 1998) a permis de définir un nombre réduit de complexes clonaux responsables des septicémies et méningites, en particulier ST11, ST32 et ST41/44 (Brehony *et al.*, 2007). Ces complexes clonaux plus virulents sont dits « invasifs ».

Des études génomiques comparatives entre des souches invasives et des souches de portage montrent très peu de régions du chromosome spécifiques des souches invasives (Perrin *et al.*, 2002). Cela confirme que l'essentiel des facteurs de virulence sont partagés par toutes les souches de *N. meningitidis*. Pourtant ces différentes études ont mis en évidence certains loci associés aux souches virulentes, en particulier, la présence d'un prophage filamenteux, le MDA (*meningococcal disease associated*) (Bille *et al.*, 2005). Une étude statistique suggère que ce phage filamenteux participe de 20 à 40% de la virulence des souches invasives (Bille *et al.*, 2008). Quand il est exprimé, ce phage est capable de s'intégrer dans différents loci du génome. Il est proposé qu'il participe à la virulence en augmentant la fluidité génétique du méningocoque et donc son adaptabilité à son hôte (communications personnelles E. Bille et H. Omer). D'autres loci sont associés aux souches virulentes, par exemple le gène *nadA* qui code une adhésine est principalement présent dans des souches isolées de patients (Comanducci *et al.*, 2002).

Un facteur commun aux différentes souches invasives semble être une capacité accrue à éviter ou lutter contre le système immunitaire. Cela corrobore l'observation précédente, il existe un risque plus important d'infection à méningocoque si l'hôte présente une déficience du système immunitaire ou si la bactérie est plus résistante à cette immunité.

Tous ces critères ont permis de proposer une hypothèse pour expliquer la survenue d'épidémies de méningites en Afrique. Cette hypothèse implique une association entre des facteurs bactériens et des facteurs environnementaux. Des souches, à forte capacité de transmission et d'invasivité, se répandent au sein d'une population dans laquelle règne une grande proximité sociale. Puis l'harmattan, un vent de sable irritant, permet le déclenchement simultané de centaines ou milliers de cas, en ouvrant une voie au travers de la muqueuse respiratoire fragilisée (Roberts, 2008).

B. Rôle des Pili de type IV dans la colonisation

Autant dans le cycle commensal que dans la pathogénèse de *N. meningitidis*, l'adhésion puis la colonisation des cellules de l'hôte sont des étapes essentielles. L'adhésion et la colonisation de l'épithélium nasopharyngé sont un maillon indispensable du cycle commensal. L'adhésion est un prérequis à l'internalisation, porte d'entrée proposée pour la circulation sanguine. Dans le sang, la colonisation de l'endothélium est responsable de la persistance de la bactérie. Enfin, le long de la BHE, l'adhésion et/ou la colonisation précèdent le franchissement, donc la méningite, quelle que soit la voie empruntée par le pathogène, paracellulaire ou transcellulaire.

Les deux mécanismes essentiels pour la colonisation d'une cellule sont : la capacité d'adhérer sur cette cellule et la capacité des bactéries à interagir entre elles pour former une microcolonie.

Chez *N. meningitidis*, plus de 80% des souches de portage et la quasi-totalité des souches issues de septicémies sont capsulées (Claus *et al.*, 2002; Nassif *et al.*, 1997; Stephens and McGee, 1981). Les adhésines auxiliaires sont donc masquées par la capsule. Dans les premières heures de la colonisation et dans le sang, les Pt4 sont le vecteur majeur de l'adhésion du méningocoque aux cellules humaines.

L'agrégation bactérienne dépend elle aussi des Pt4 (Helaine *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2001). En absence de pili, le méningocoque est incapable de former d'agrégats en suspension ou sur cellules.

Les Pt4 sont donc le facteur essentiel de la colonisation des cellules par le méningocoque.

I. Les fimbriae

De nombreuses espèces bactériennes commensales et pathogènes arborent des appendices fibrillaires non flagellaires. Ces appendices ont été nommés pili ou fimbriae. Plusieurs dizaines de pili structurellement différents ont été décrits au cours des 50 dernières années. Pour plus de clarté, un classement récent regroupe ces différents pili en fonction du mode d'assemblage de la fibre (pour revue (Fronzes *et al.*, 2008; Telford *et al.*, 2006).

Ainsi, chez les bactéries à Gram positif, il existe deux groupes de pili :

- Les « Pili » qui peuvent former une fibre de plusieurs microns de long pour 5 à 10 nm de diamètre. Les sous-unités formant la fibre sont sécrétées par le système « *sortase* » et assemblées par liaisons covalentes à l'extérieur de la bactérie. On retrouve ces pili par exemple dans les espèces *Streptococcus* et *Corynebacterium*.
- Les « Fibrils » de *Streptococcus* sont plus courts et plus fins : 0,5 µm de long pour 1 à 2 nm de diamètre. Ces pili, encore mal caractérisés, sont également assemblés par liaison covalente des sous-unités structurales.

Chez les bactéries à Gram négatif, les pili ont été regroupés en quatre groupes majeurs (Figure 6) :

- Les « Chaperone-usheer Pili » sont caractérisés par l'existence d'une protéine chaperonne qui prend en charge les sous-unités du pilus dans le périplasma et les dirige vers la plateforme d'assemblage membranaire appelé « usheer ». Dans cette catégorie, on retrouve notamment les Pili de type I, les P Pili, les S Pili, les Hif Pili, les PMF (*proteus mirabilis fimbriae*), les Dr/Afa adhesine family Pili et les F1 Pili.
- Il existe un second groupe de pili parfois regroupé avec ce premier appelé « alternate Chaperone Pili ». Le principe de l'assemblage est le même mais les protéines chaperonnes sont structurellement et fonctionnellement distinctes des premières. Cela suggère une origine évolutive différente. On retrouve dans ce groupe les CS1 Pili et les CFA Pili de *Escherichia coli*.
- Les « Curli Pili » sont caractérisés par un assemblage à l'extérieur de la bactérie par agrégation de la sous-unité majeure, la curline, sur une protéine membranaire dite de nucléation.

-Les Pili de type IV sont synthétisés par une machinerie moléculaire ressemblant au système de sécrétion de type II (SST2) (pour revue (Nunn, 1999 ; Sauvonnnet *et al.*, 2000). On les retrouve chez de nombreuses espèces bactériennes appartenant à des groupes phylogénétiques très divers, en particuliers de nombreuses protéobactéries mais également des cyanobactéries et des firmicutes.

Cette famille de pili est séparée en deux groupes en fonction des caractéristiques des sous-unités constituant la fibre : les pilines. Ces protéines possèdent un peptide signal en position N-terminal qui peut-être court (5 à 8 acides aminés) pour le groupe IVa ou long (15 à 30 acides aminés) pour le groupe IVb. Dans le groupe IVa, on retrouve les Pt4 des *Neisseria* et de *P. aeruginosa*, les PAK pili et les PAO Pili. Dans le groupe IVb, on retrouve notamment les BFP (*Bundle forming pili*) d'*E. coli*, les « thin Pili » codés par le plasmide R64 de *E. coli* et les TCP (*Toxin co-regulated pilus*) de *Vibrio cholerae*.

Malgré des origines évolutives probablement indépendantes, tous ces types de pili semblent partager à la fois une structure fibreuse comparable et des fonctions convergentes. Ces structures sont généralement impliquées dans l'interaction entre la bactérie et son environnement et permettent l'adhésion à un support (souvent les cellules de l'hôte) et/ou l'agrégation des bactéries entre elles (Fronzes *et al.*, 2008; Telford *et al.*, 2006).

II. Biogenèse des Pili de type IV

Malgré des différences entre les Pt4 chez les espèces bactériennes, il existe de nombreuses similarités dans leurs structures et leurs fonctions. Le nombre de gènes impliqués dans la formation des Pt4 varie d'une espèce à l'autre, mais converge entre 10 et 15 gènes en moyenne. Ainsi 14 gènes sont nécessaires pour la synthèse des BFP chez *E. coli*, 12 pour les « thin Pili », 15 pour les TCP de *V. cholerae* mais plus de 30 chez *P. aeruginosa* (Manning, 1997 ; Taniguchi *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 1999). Chez les *Neisseria*, l'essentiel des connaissances sur la biogenèse des Pt4 est basée sur les travaux des groupes de V. Pelicic pour *N. meningitidis* et de M. Koomey pour *N. gonorrhoeae*. Le groupe de V. Pelicic a récemment montré que 20 à 23 gènes sont impliqués dans la biogenèse et la fonctionnalité des

Pt4 chez le méningocoque et a proposé une classification pour ces différents gènes (Figure 7) (Carbonnelle *et al.*, 2006 ; Pelicic, 2008). Dans un souci de clarté, l'essentiel de ce chapitre sera basé sur cette classification et sur les travaux de ces deux groupes particuliers.

La classification proposée repose sur une analyse phénotypique des mutants des différents gènes *pil* et des doubles mutants dans lesquels la rétraction des pili est abolie par insertion d'une mutation dans le gène *pilT* (Carbonnelle *et al.*, 2006). Dans cette étude, trois groupes de protéines dont les mutants ont des phénotypes distincts ont été définis :

- Les protéines Pil indispensables à la biogenèse des Pt4 pour lesquels l'absence de la protéine se traduit invariablement par l'absence de Pt4. Ce groupe contient la piline PilE qui constitue la fibre, la pré-piline peptidase PilD essentielle pour la maturation de la piline, l'ATPase PilF qui fournit l'énergie nécessaire à l'assemblage de PilE en polymère et 4 autres protéines : PilM, PilN, PilO et PilP.

- Les protéines dispensables à la piliation mais qui jouent parfois un rôle particulier dans la fonctionnalité des Pt4. Malgré l'absence d'une de ces protéines, on observe des pili. On retrouve dans ce groupe de protéines : les moteurs moléculaires PilT, PilU et PilT2 et les pilines mineures.

- Les protéines Pil en l'absence desquelles la quantité de pili est fortement réduite, mais dont le défaut est compensable par l'introduction d'une seconde mutation au locus *pilT*. Une explication proposée est que ces protéines sont importantes pour la stabilité des Pt4. En absence de l'une de ces protéines, l'équilibre entre l'élongation et la rétraction des Pt4 se déplace en faveur de la rétraction aboutissant à une quasi-absence de Pt4 à la surface des bactéries. C'est le cas par exemple de PilW qui influe sur la stabilité du pore. Dans cette catégorie, on retrouve également PilC, PilG et les pseudopilines.

1. La piline

Les Pt4 sont le résultat de polymérisation de plusieurs milliers de sous-unités de pilines. La piline PilE est une protéine d'environ 150 à 180 acides aminés. La structure tridimensionnelle de la piline de *N. gonorrhoeae* a été résolue par une analyse cristallographique de la diffraction des rayons X (Figure 8). La piline du gonocoque est constituée de deux domaines majeurs : La région α en position N-terminale et un domaine globulaire en position C-terminal. Une longue hélice alpha hydrophobe très conservée en N-

terminal, entre les résidus +2 et +54, est connectée par un domaine α - β (55-77) au domaine globulaire hydrophile en position C-terminal de la protéine. Ce domaine globulaire est composé de 4 feuillets β et d'une région comprise entre deux cystéines reliées par un pont disulfure (Parge *et al.*, 1995). L'hélice hydrophobe est indispensable pour la formation du pilus. Le modèle d'assemblage généralement admis suggère que ce sont les interactions hydrophobes générées par ces hélices au cœur de la fibre qui permettent l'assemblage des sous-unités entre elles et assurent la résistance du pilus (Craig *et al.*, 2006; Forest and Tainer, 1997 ; Parge *et al.*, 1995). Une mutation ponctuelle dans cette séquence suffit à empêcher l'assemblage des pili (Aas *et al.*, 2007). La région globulaire contient une région hypervariable, caractérisée par un pont disulfure très conservé entre les pilines et par deux courts feuillets β supplémentaires. Cette région semble jouer un rôle essentiel dans la fonctionnalité des pilines (Figure 8) (Parge *et al.*, 1995).

La piline est synthétisée sous la forme d'un précurseur, la prépiline, possédant une séquence peptidique signal en N-terminal. Chez *N. meningitidis*, PilE a une séquence peptidique de 7 acides aminés. La prépiline est amenée au périplasma par la voie de sécrétion « Sec », ancrée à la membrane interne, puis le peptide signal est clivé par la prépiline-peptidase PilD (Francetic *et al.*, 2007; Strom *et al.*, 1993). La piline ainsi clivée est alors assemblée en fibre par la machinerie de biosynthèse (Figure 9). Lors de la rétraction des pili, la protéine est stockée dans le périplasma où il semble qu'elle puisse être à nouveau utilisée pour être intégrée dans un nouveau pilus (Morand *et al.*, 2004). Dans certaines conditions, une forme tronquée de piline peut être sécrétée par la bactérie. La région hydrophobe de la piline, essentielle à l'assemblage en pilus, est clivée après le résidu +39. La fonction de cette forme clivée n'est pas connue mais permet peut-être d'évacuer la piline surabondante pour limiter un effet toxique, ou encore peut participer à l'échappement au système immunitaire en entrant en compétition avec les pili pour l'affinité avec des IgA sécrétoires (Haas *et al.*, 1987 ; Koomey *et al.*, 1991).

Une caractéristique originale de la protéine PilE est qu'elle subit des modifications post-traductionnelles. Ce type de modifications des protéines a été beaucoup décrit chez les eucaryotes, mais n'est connu chez les procaryotes que depuis quelques années. Ces modifications concernent principalement des protéines membranaires ou sécrétées, exposées à la surface des bactéries, ce qui est le cas de PilE. Plusieurs modifications post-traductionnelles ont été décrites chez les *Neisseria* pathogènes. Il semble que la nature des modifications puisse varier d'une souche à l'autre. La sérine en position 63, très conservée, est glycosylée et porte selon les souches, soit un disaccharide (Gal(α 1-3)GlcNAc), soit un trisaccharide

(Gal(β 1-4)GlcNAc(α 1-3)DATDH) transférés grâce à l'action des enzymes codées par les gènes *galE* et *pgl* (*Piline glycosylation*) (Power *et al.*, 2003; Stimson *et al.*, 1995). Le résidu sérine en position 68 chez *N. gonorrhoeae* (S69 chez *N. meningitidis*) porte soit un résidu phosphate, soit une phosphorylcholine, soit un phosphoethanolamine, transférés par l'enzyme codée par *pptA* dans cette espèce (Aas *et al.*, 2006; Forest *et al.*, 1999 ; Hegge *et al.*, 2004 ; Warren and Jennings, 2003). Le résidu sérine en position 94 est parfois modifié avec un phosphoglycérol (Stimson *et al.*, 1996). Le fait que plusieurs structures différentes ont été caractérisées pour les mêmes résidus sérines suggère une spécificité de souche. Certains gènes codant des enzymes impliqués dans ces modifications sont soumis à la variation de phase, c'est le cas de *pglA* codant l'enzyme permettant l'ajout du second sucre sur la sérine 63 et de *pptA* codant l'enzyme de transfert de dérivés phosphates sur la sérine 68 chez *N. gonorrhoeae* (Saunders *et al.*, 2000 ; Warren and Jennings, 2003). La fonction de ces modifications post-traductionnelles reste obscure mais la glycosylation pourrait être impliquée dans la stabilisation de la piline (Marceau *et al.*, 1998 ; Marceau and Nassif, 1999). Cependant, ces modifications étant toutes exposées à la surface de la protéine et des pili, il est probable qu'elles participent à la modulation des antigènes de surface du méningocoque et ainsi à l'échappement au système immunitaire (Craig *et al.*, 2006; Parge *et al.*, 1995).

2. Structure du pilus

Plusieurs structures ont été proposées pour cette fibre. La plus récente et la plus précise, basée sur la structure de la piline de *N. gonorrhoeae* associée à de la cryomicroscopie sur Pt4 purifiés, décrit une fibre de 60 Å de diamètre et de plusieurs micromètres de long (Figure 10A) (Craig *et al.*, 2006). Le pilus a une forme hélicoïdale avec un pas de 3,6 pilines par tour. Les hélices α hydrophobes sont enroulées au centre de la structure et forment un canal creux de 5 à 10 Å qui pourrait être compressible et ainsi permettre la flexibilité des Pt4. La surface exposée est composée principalement de la région $\alpha\beta$ 55-77 contenant la sérine 63 glycosylée et la sérine 69 phosphorylée, ainsi que de la région disulfure hypervariable. Le long de la fibre apparaît une alternance de régions chargées positivement et négativement qui, selon les auteurs, permettrait à l'ADN exogène de mettre en place des interactions électrostatiques et de s'enrouler autour du pilus (Figure 10B) (Craig *et al.*, 2006). Ces mêmes patches de charge pourraient également participer à l'interaction avec les cellules de l'hôte.

Une caractéristique importante des Pt4 est leur capacité à interagir pour former des fagots appelés « Bundles » (Figure 10C) (pour revue (Craig *et al.*, 2004). Les fibres sont capables de s'accoler les unes aux autres parallèlement, à partir d'une seule bactérie, ou antiparallèlement, entre deux bactéries. Les bundles semblent avoir un diamètre privilégié d'une vingtaine de nanomètres, correspondant à une dizaine de Pt4 (Biais *et al.*, 2008). Cette capacité est imputée à des interactions électrostatiques à la surface des pili (Nassif *et al.*, 1993). Cette capacité est importante pour les fonctions associées aux pili. Dans un premier temps les forces de rétractions exercées par les différentes fibres d'un même bundle semblent additives, ainsi un bundle d'une dizaine de pili peut exercer une force de rétraction de l'ordre du nanoNewton (Biais *et al.*, 2008). Ensuite, certains variants de pilines qui perdent leurs capacités à former des bundles perdent également leur capacité à agréger (Nassif *et al.*, 1993). Cela suggère que la capacité à former des bundles est essentielle pour l'interaction entre les bactéries au sein d'une colonie.

3. La prépiline peptidase

La prépiline peptidase PilD est une enzyme protéolytique essentielle à la biosynthèse des Pt4. Cette enzyme a été très bien caractérisée chez *P. aeruginosa* et reconnaît une classe particulière de protéines, portant un peptide signal de taille variable, parmi lesquels on retrouve la piline PilE (Nunn and Lory, 1991; Strom *et al.*, 1993). PilD est ancrée dans la membrane interne du périplasme et clive le peptide signal de la prépiline entre une glycine et une phénylalanine pour les pilines du groupe IVa et entre une glycine et une méthionine pour le groupe IVb (Nunn and Lory, 1991). Dans le groupe IVa, la phénylalanine est ensuite méthylée par un second domaine de PilD indépendant de l'activité protéolytique (Strom *et al.*, 1993). La méthylation est dispensable à la synthèse des Pt4 mais pourrait jouer un rôle dans la stabilité de la piline dans le périplasme. PilD est très conservée dans les espèces possédant des Pt4. Il semble que deux classes de prépiline-peptidases existent, l'une spécifique des pilines de type IVa et l'autre des pilines de type IVb (de Bentzmann *et al.*, 2006).

4. Le piston

Parmi les 7 protéines indispensables à la biosynthèse des pili du méningocoque, on retrouve les 4 protéines PilM, PilN, PilO et PilP. Les gènes codant ces protéines sont organisés en opéron avec le gène codant la sécrétine PilQ dans le génome de *N. meningitidis* (Figure 7) (Carbonnelle *et al.*, 2006). Il est proposé que ces 4 protéines, très conservées au sein des espèces, forment la plateforme d'assemblage du pilus (Nudleman and Kaiser, 2004 ; Pelicic, 2008). Un rôle de pilotine a été proposé pour PilP chez *N. gonorrhoeae*, la protéine permettrait la bonne localisation et la stabilisation de la sécrétine PilQ (Drake *et al.*, 1997). Cependant, ces résultats sont controversés et cette fonction a été exclue chez *N. meningitidis* (Balasingham *et al.*, 2007; Carbonnelle *et al.*, 2005).

5. L'énergie

Les pili sont des structures dynamiques, sans cesse allongés et rétractés. Deux enzymes assurent cette dynamique chez *N. meningitidis* (pour revue (Burrows, 2005). Ces deux protéines appartiennent à la famille des AAA ATPases (*ATP Associated with various cellular Activities*) et comportent des séquences consensus « Walker box » A et B permettant la liaison à l'ATP (Planet *et al.*, 2001; Walker *et al.*, 1982). Il est proposé que la liaison et l'hydrolyse de l'ATP permette un changement de conformation de ces enzymes suffisant pour fournir l'énergie nécessaire à l'ajout ou au retrait d'une sous-unité de piline dans le pilus (Figure 11A) (Crowther *et al.*, 2005).

La protéine PilF assure l'élongation de la fibre, elle est indispensable à la biosynthèse des pili (Figure 9) (Carbonnelle *et al.*, 2006).

La protéine PilT permet la rétraction des pili (Figure 9). Cette fonction a été démontrée *in vitro*. En absence de PilT, le méningocoque présente près de dix fois plus de pili et perd les fonctions associées au pili nécessitant la rétraction des fibres (motilité et compétence). Une estimation montre que PilT serait capable de rétracter de l'ordre de 1500 unités de pilines par seconde (Burrows, 2005). La force de rétraction des pili a été mesurée, elle correspond à environ 100 pN par fibre (Maier *et al.*, 2002). Cette force de rétraction est considérable pour

un objet aussi petit qu'une bactérie et de nombreux groupes étudient la fonction et les conséquences d'une telle force à l'échelle microscopique, en particulier en ce qui concerne l'interaction avec les cellules humaines. L'activité enzymatique mesurée et la résolution de la structure de PilT chez *Aquifex aeolicus*, une bactérie thermophile, par diffraction des rayons X suggèrent que PilT fonctionne en homo ou hétéro-hexamère avec d'autres ATPases de la même famille (Figure 11B) (Herdendorf *et al.*, 2002 ; Satyshur *et al.*, 2007).

Le gène *pilT* a deux paralogues dans le génome de *N. meningitidis* : *pilU* et *pilT2*. Les deux protéines, PilU et PilT2, possèdent des séquences consensus « Walker box » bien que leurs fonctionnalités n'aient pas été étudiées. Chez *P. aeruginosa*, les gènes orthologues de *pilT* et *pilU*, appelés par le même nom, codent des protéines toutes deux impliquées dans la rétraction de la fibre (pour revue (Burrows, 2005). Des mutants de *pilT* ou *pilU* ont tous deux un phénotype hyperpilié et non motile. Il existe cependant une différence phénotypique entre les deux mutants puisqu'un mutant du gène *pilU* est toujours sensible au bactériophage PO4 alors qu'un mutant de *pilT* ne l'est plus (Whitchurch and Mattick, 1994). La sensibilité au bactériophage nécessite que ce phage se lie au pili puis que ceux-ci soient rétractés. Ce résultat suggère donc qu'il existe toujours une rétraction résiduelle, probablement dépendante de PilT, dans un mutant de PilU. Chez *N. meningitidis*, aucun phénotype n'a été décrit pour le mutant de PilU, cependant, chez *N. gonorrhoeae* le mutant de PilU présente un subtil défaut d'agrégation et adhère mieux aux cellules humaines (Park *et al.*, 2002). Cela suggère que la protéine est peut-être fonctionnelle dans cette espèce et qu'elle pourrait effectivement jouer un rôle dans la biosynthèse des pili. Un mutant du gène *pilT2* ne présente pas de défaut décrit, sa fonction est encore inconnue.

6. La sécrétine

Le pilus est assemblé dans le périplasme de la bactérie puis extrudé par un pore formé d'un dodécamère de sécrétine : PilQ (Figure 9) (Collins *et al.*, 2004; Wolfgang *et al.*, 2000). La présence du pore de PilQ n'est pas nécessaire à la synthèse de la fibre, mais indispensable à son extrusion de la bactérie, en absence de PilQ, la bactérie ne présente pas de Pt4 (Carbonnelle *et al.*, 2006; Drake and Koomey, 1995; Wolfgang *et al.*, 2000). Contrairement au SST2 de *E. coli*, pour lequel la sécrétine PulD nécessite une pilotine PulS pour son assemblage et son insertion dans la membrane externe, PilQ ne semble pas posséder de

pilotine chez le méningocoque (Carbonnelle *et al.*, 2006; Collin *et al.*, 2007). Son transport et son insertion dans la membrane externe sont assurés par la voie dépendant de Omp85 (Voulhoux *et al.*, 2003). Le pore formé par le dodécamère de PilQ est extrêmement résistant, il est ainsi possible de visualiser ces multimères sur un gel de polyacrylamide après une électrophorèse en conditions dénaturantes (Collins *et al.*, 2003). La protéine PilW participe à la stabilisation ou à l'assemblage du dodécamère. En absence de PilW, la piliation est fortement réduite et il est difficile de visualiser des multimères de PilQ (Carbonnelle *et al.*, 2005). Cependant, PilW n'a pas les caractéristiques d'une pilotine puisque seule la stabilité du multimère est impliquée, la stabilité et l'insertion de la protéine PilQ ne semblent pas dépendre de sa présence.

En dehors des Pt4, le pore formé par PilQ permet le passage d'autres molécules à travers la membrane externe du méningocoque, notamment certains antibiotiques ou le bactériophage MDA (Bille *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005)

7. Le cas particulier de PilC

La protéine PilC est codée en deux loci appelés *pilC1* et *pilC2* (Figure 7). Ces loci sont sous variation de phase, l'absence de protéine PilC conduit à une absence de pili compensable par l'introduction d'une seconde mutation au locus *pilT* (Carbonnelle *et al.*, 2006; Jonsson *et al.*, 1991). Contrairement à *N. gonorrhoeae* chez qui les deux loci semblent coder une même protéine PilC, les loci *pilC1* et *pilC2* de *N. meningitidis* codent deux protéines dont les fonctions sont partiellement différentes (Jonsson *et al.*, 1995). La protéine PilC1 a longtemps été décrite comme l'adhésine du méningocoque, puisqu'elle est indispensable à l'adhésion dépendante des Pt4 sur cellules humaines, et elle a été localisée à l'apex du pilus (Nassif *et al.*, 1994 ; Rudel *et al.*, 1995b). Cette fonction et cette localisation ont été remises en question ; dans un premier temps, la protéine PilC1 a les caractéristiques d'une protéine de la membrane externe et une détection directe la situe effectivement dans cette structure (Rahman *et al.*, 1997). Ensuite, un triple mutant *pilC1/pilC2/pilT* possède des Pt4, ceux-ci sont non adhérents mais également non agrégatifs, suggérant un rôle possible de PilC1 et PilC2 dans la « maturation fonctionnelle » des Pt4 plutôt que dans l'adhésion directe (Carbonnelle *et al.*, 2006). La protéine PilC2 est également impliquée dans l'interaction avec les cellules humaines puisqu'elle semble jouer un rôle dans l'interaction avec certains types cellulaires.

En particulier, PilC2 semble interagir spécifiquement avec les érythrocytes car le mutant de *pilC2* n'est plus capable d'agglutiner le sang humain (résultats personnels) (Greenblatt *et al.*, 1988). Il existe toutefois une fonction redondante entre ces deux protéines puisque la présence d'une seule suffit à maintenir la présence de Pt4. Chez *N. gonorrhoeae* les deux protéines PilC participent à l'adhésion de manière équivalente, l'une pouvant compenser l'autre sur la plupart des types cellulaires (Kirchner and Meyer, 2005; Rudel *et al.*, 1995a).

8. Les autres pilines

Les protéines de la dernière catégorie ne sont pas directement impliquées dans l'assemblage des pili bien que certaines soient nécessaires à leur stabilité. Ces protéines présentent des caractéristiques proches de la piline, en particulier une séquence signal d'adressage à la prépiline-peptidase (Figure 12A) (Carbonnelle *et al.*, 2006; Winther-Larsen *et al.*, 2005). Ces protéines ont été séparées en deux groupes, les « pilines mineures » et les « pseudopilines ». Les pilines mineures présentent toutes les caractéristiques de la piline PilE. Elles possèdent la séquence signal, une région α hydrophobe et une région globulaire et elles sont purifiées avec les Pt4. Elles semblent donc capables de s'intégrer dans le pilus au même titre que PilE quoique en quantité restreinte. Les pseudopilines présentent des caractéristiques similaires mais l'absence de l'une d'entre elles se traduit par une absence de pili. Elles semblent donc impliquées dans la stabilité de la fibre. Les pseudopilines sont nommées ainsi par homologie au SST2. Notons que dans le SST2, les pseudopilines doivent elles-mêmes leur nom à leur ressemblance avec les pilines des Pt4.

a. Pilines mineures

Il existerait 3 pilines mineures chez *N. meningitidis*, PilX, PilV et ComP. Le modèle proposé est qu'une piline mineure se substitue à la piline de manière régulière dans le pilus, toutes les dix à cent unités (Figure 12B). Cette localisation a été montrée pour PilX par détection directe. La protéine est effectivement visualisée tout au long de la fibre (Helaine *et al.*, 2005). Une fraction de la protéine PilX, tronquée de son hélice α hydrophobe, a été cristallisée et analysée par diffraction des rayons X. Cette étude confirme une structure

similaire à celle de la piline (Figure 12B) (Helaine *et al.*, 2007). Le cœur de la région globulaire est formé comme pour PilE de quatre feuillets β , la région $\alpha\beta$ contient deux hélices α ($\alpha 1$ et $\alpha 2$) et la région disulfure une troisième hélice $\alpha 3$ remplaçant les deux feuillets β observés pour PilE. L'intégration de PilV et ComP dans les pili n'a pas été formellement démontrée. Toutefois, ces protéines sont purifiées avec les Pt4 de la même manière que PilX, ce qui suppose une interaction directe entre les Pt4 et PilV ou ComP. La présence des pilines mineures est dispensable à la synthèse de pili et celles-ci ne semblent pas capables de former un pilus en absence de PilE (Helaine *et al.*, 2005).

Certaines fonctions associées aux Pt4 ont été attribuées à ces protéines, ainsi PilX est essentielle à l'agrégation bactérienne et ComP à la compétence pour la transformation des *Neisseria* (Helaine *et al.*, 2005; Wolfgang *et al.*, 1999). Chez *N. gonorrhoeae*, la protéine PilV participe à l'adhésion dépendant des Pt4 puisqu'un mutant ne l'exprimant plus voit son adhésion diminuer sur cellules épithéliales (Winther-Larsen *et al.*, 2001). Cette protéine joue également un rôle non élucidé dans les modifications post-traductionnelles de la piline ; en absence de PilV, la phosphorylcholine décorant la sérine en position 68 est remplacée, en partie, par un phopshoéthanolamine (Hegge *et al.*, 2004). Cependant, ces phénotypes ne sont pas retrouvés dans un mutant de *pilV* chez *N. meningitidis*.

b. Pseudopilines

Il existe 4 pseudopilines chez *N.meningitidis* : PilH, PilI, PilJ et PilK. Les gènes codant ces protéines sont organisés en opéron avec le gène codant PilX. Ces protéines sont importantes pour la stabilité des pili puisqu'un mutant de l'une d'elles présente une piliation fortement réduite, compensable par la mutation de *pilT* (Carbonnelle *et al.*, 2006; Winther-Larsen *et al.*, 2005). De plus, la séquence de PilJ est beaucoup plus longue que celle d'une piline classique. Ces arguments suggèrent un fonctionnement différent de celui des pilines mineures. Ces protéines ont été très peu étudiées chez le méningocoque. Chez le gonocoque, il a été montré qu'elles sont toutes clivées par PilD et qu'elles sont purifiées avec les pili de la même manière que l'orthologue de PilX appelé PilL (Winther-Larsen *et al.*, 2005).

Les protéines orthologues de ces pseudopilines dans le SST2 chez *E. coli* ont été cristallisées et un complexe GspK-GspI-GspJ décrit (Figure 12C) (Korotkov and Hol, 2008). Il est proposé que ce complexe forme la plateforme d'extrusion du SST2 sous laquelle la pseudopiline majoritaire GspG pourrait s'assembler (Forest, 2008; Korotkov and Hol, 2008).

La surexpression de GspG permet effectivement la synthèse d'un pseudopilus principalement constitué de cette protéine (Sauvonnet *et al.*, 2000). Cette plateforme pourrait correspondre à l'apex du Pilus de type IV (Forest, 2008). Il est donc envisageable que les protéines PilI, PilJ et PilK forment l'apex du pilus sous lequel la piline PilE s'assemblerait pour former la fibre (Figure 9).

9. Les autres protéines

La protéine PilG est une protéine membranaire très conservée dans les Pt4 chez les différentes espèces (Pelicic, 2008). Son orthologue chez *P. aeruginosa* est essentiel à la biosynthèse des Pt4. Cette fonction ne semble pas conservée chez *N. meningitidis*. Son rôle n'est pas encore connu chez le méningocoque mais l'absence de la protéine conduit à une réduction importante de la quantité de pili, compensable par une seconde mutation au locus de *pilT*. Cependant, les Pt4 restaurés semblent fonctionnels contrairement à ceux d'un mutant de *pilC* (Carbonnelle *et al.*, 2006).

Une dernière protéine PilZ est impliquée dans la stabilité des pili chez *N. meningitidis*. Sa fonction précise dans les Pt4 n'a pas non plus été déterminée.

III. Fonctions associées aux Pili de type IV

La principale raison pour laquelle les Pt4 sont considérés comme l'un des facteurs de virulence majeur chez les bactéries à Gram négatif est lié à leur large spectre de fonctions. De nombreuses fonctions leur sont attribuées, parmi lesquelles l'interaction avec les cellules de l'hôte, l'agrégation bactérienne mais aussi l'induction de signaux cellulaires, la motilité de la bactérie et sa compétence naturelle pour la transformation.

1. Adhésion

L'adhésion dépendante des pili a été largement étudiée par le passé et une grande partie des bases moléculaires ont été établies. Paradoxalement, les mécanismes moléculaires de cette adhésion restent mal compris. L'adhésion dépend de la présence de Pt4, des caractéristiques de la piline Pile et des protéines PilC (Nassif *et al.*, 1994).

a. Rôle de PilC1

La protéine PilC1 est essentielle à l'adhésion. En absence de PilC1, le méningocoque perd la capacité à adhérer sur des cellules épithéliales et endothéliales via ses pili. Le mécanisme moléculaire de cette adhésion n'est toujours pas décrypté. La protéine PilC2, si elle est exprimée au même niveau que PilC1, peut compenser partiellement cette perte d'adhésion (communication personnelle C. Bernard). De plus, le mutant du gène *pilC2* n'agglutine plus le sang humain alors que le mutant de *pilC1* n'a aucun effet sur ce phénotype. Enfin, la protéine PilT influence le niveau d'adhésion notamment en modulant le niveau d'expression de PilC1 (Yasukawa *et al.*, 2006). Il semble donc que comme pour le gonocoque, les deux protéines PilC participent à l'interaction avec les cellules de l'hôte et qu'il existe une spécificité cellulaire. Cette spécificité d'interaction avait déjà été observée sans être attribuée à PilC2 (Greenblatt *et al.*, 1988).

b. Rôle de Pile

La protéine Pile joue également un rôle dans l'adhésion. Certains variants de piline exhibent des capacités accrues ou réduites à adhérer sur cellules humaines (Lambden *et al.*, 1980 ; Nassif *et al.*, 1993 ; Nassif *et al.*, 1994). Plusieurs hypothèses expliquent ce phénomène, soit la piline interagit directement avec un récepteur, soit ce sont les caractéristiques biochimiques des pili qui modulent l'adhésivité. La piline pourrait se lier directement à un récepteur, la variation antigénique modifierait alors la structure de la protéine modulant l'interaction entre le ligand et son récepteur. C'est le cas chez *P. aeruginosa* chez qui la région conservée $\alpha\beta$ de la piline PilA est impliquée dans une interaction directe avec un résidu osidique (β -D-GalNAc(1-4) β -D-Gal) de la cellule hôte

(Hazes *et al.*, 2000). Il est proposé que les modifications post-traductionnelles, en particulier les glycosylations, participent à moduler l'adhésivité des pili. Cet effet peut être direct ou indirect. La variation antigénique est capable de créer de nouveaux sites modifiables sur la piline qui influent sur l'adhésion (Virji *et al.*, 1993b). Enfin, *in vitro* l'agrégation des bactéries influence l'adhésion. La capacité des Pt4 à former des bundles, donc à permettre l'agrégation des bactéries, influence l'adhésion. Cette capacité à former des bundles varie d'un variant de piline à l'autre (Marceau *et al.*, 1995).

Un aspect particulier de l'adhésion dépendante des pili chez les *Neisseria* pathogènes, est sa spécificité pour l'Homme. Cela suggère une interaction avec une molécule variable entre espèces. Des travaux récents montrent que les résidus osidiques contenus dans le lait humain ou bovin inhibent l'adhésion dépendante des pili, ce qui suggère une interaction entre certains sucres et les pili (Hakkarainen *et al.*, 2005). Les résidus osidiques décorant les récepteurs cellulaires sont généralement de bons candidats pour une interaction spécifique, en effet ces résidus sont très variables entre espèces, entre individus, et parfois d'un type cellulaire à l'autre.

c. Un récepteur controversé

Un récepteur cellulaire a été décrit pour les pili de *N. gonorrhoeae* et *N. meningitidis* : la glycoprotéine CD46 (ou MCP, *membrane cofactor protein*) (pour revue (Gill and Atkinson, 2004)). *In vitro*, les pili se lient à CD46. L'expression du récepteur humain dans des cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO) suffit à permettre l'adhésion des deux espèces bactériennes sur ces cellules si elles expriment des pili (Kallstrom *et al.*, 1997). Cette adhésion dépend de plusieurs domaines de CD46 dont le domaine de contrôle du complément 3 (CCP-3) et la région cytoplasmique du récepteur (Kallstrom *et al.*, 2001). Cette adhésion est suivie d'une phosphorylation du récepteur sur une tyrosine de la région cytoplasmique, cette phosphorylation semble nécessaire pour une adhésion optimale (Lee *et al.*, 2002). Enfin, l'adhésion de pili purifiés sur des cellules eucaryotes est responsable d'une libération du calcium intracellulaire dans le cytosol. Cette libération de calcium est inhibée par l'utilisation d'anticorps dirigés contre CD46 (Kallstrom *et al.*, 1998). Après l'adhésion, la quantité de récepteurs CD46 diminue dans la membrane, ce mécanisme dépend de la rétraction des pili (Gill *et al.*, 2003). Il semble que le récepteur soit sécrété dans le milieu via des vésicules de membranes (Gill *et al.*, 2005). Récemment un modèle de souris humanisées exprimant le

récepteur CD46 humain a permis d'étudier certains aspects de l'infection par *N. meningitidis* (Sjolinder and Jonsson, 2007). Cependant, le rôle de CD46 dans l'adhésion est actuellement toujours en débat. En effet, ces résultats ne sont pas reproduits par tous les groupes de recherche et il a été montré que *N. gonorrhoeae* peut adhérer sur cellules épithéliales par l'intermédiaire de ses pili et en absence de CD46. De plus, la liaison des pili à CD46 semble indépendante des protéines PilC, molécules essentielles dans l'adhésion (Kirchner *et al.*, 2005; Kirchner and Meyer, 2005). Aujourd'hui, la plupart des groupes de Recherche s'accordent à dire que CD46 participe à l'adhésion du méningocoque dans certaines conditions mais que le récepteur des pili, s'il existe, reste à découvrir.

2. Agrégation

N. meningitidis forme des agrégats de plusieurs dizaines ou centaines de bactéries en suspension, sur certaines surfaces abiotiques et à la surface des cellules (Figure 13). Ces agrégats sur cellules, les microcolonies, sont importants, *in vitro*, dans la colonisation des cellules (Helaine *et al.*, 2005; Marceau *et al.*, 1995). En présence de capsule, la formation de ces agrégats en suspension et sur cellules dépend uniquement de la présence de Pt4. La formation de biofilms sur des surfaces abiotiques est indépendante des Pt4, mais celle-ci est inhibée par la présence de capsule. Cela suggère un mécanisme moléculaire différent et correspond peut-être au comportement des bactéries pendant l'adhésion intime (Lappann *et al.*, 2006; Yi *et al.*, 2004).

a. Rôle de PilX

L'agrégation entre les bactéries dépend de la capacité des Pt4 à former des bundles parallèles et antiparallèles. Deux protéines sont impliquées dans l'agrégation : PilE et PilX.

La piline mineure PilX est indispensable à l'agrégation (Helaine *et al.*, 2005; Helaine *et al.*, 2007). Une bactérie n'exprimant plus PilX est toujours capable de former des bundles mais ne peut plus en établir avec les bactéries voisines. Il est proposé que des interactions homotypiques PilX/PilX dans les pili, stabilisent les bundles antiparallèles en luttant contre la rétraction des pili puisque des mutants *pilX/pilT* retrouvent leur capacité à former des

agrégats. Ce résultat suggère également que la rétraction des pili, par l'intermédiaire de la protéine PilT, s'oppose à l'agrégation.

b. Rôle de PilE

Un variant de piline nommé « piline SA », est incapable de former des bundles parallèles et à priori antiparallèles, les bactéries exprimant uniquement ce variant présente une incapacité à agréger *in vitro* (Marceau *et al.*, 1995; Nassif *et al.*, 1993). L'hypothèse proposée suggère que des interactions électrostatiques entre les charges positives et négatives du pilus permettent la formation de ces bundles (Craig *et al.*, 2006). Un variant de piline présentant des charges différentes voit alors sa capacité à établir des liaisons électrostatiques modifiées. Ces interactions seraient importantes pour la formation des bundles parallèles et antiparallèles.

3. Compétence

Comme d'autres bactéries, les *Neisseria* sont naturellement compétentes pour la transformation par de l'ADN exogène (Avery *et al.*, 1944; Hamilton and Dillard, 2006). Cette compétence dépend de la présence de Pt4.

a. Rôle de ComP

L'ADN exogène se lie aux Pt4 par des interactions électrostatiques non spécifiques (Craig *et al.*, 2006). Bien que la raison moléculaire ne soit pas connue, cette interaction nécessite la présence de la piline mineure ComP dans les pili (Treangen *et al.*, 2008; Wolfgang *et al.*, 1999). Chez le gonocoque, la piline mineure PilV a l'effet inverse et modère la compétence (Aas *et al.*, 2002a). L'ADN est amené dans le périplasme grâce à la rétraction des Pt4 via PilT. Dans le périplasme, l'ADN est pris en charge par ComE, puis par les protéines ComL, Tcp et enfin ComA (Aas *et al.*, 2002b; Chen and Gotschlich, 2001). L'ADN est mené au cytoplasme où il peut recombiner avec le chromosome grâce à la machinerie de

recombinaison homologue. L'efficacité de transformation de l'ADN dépend de la présence d'une séquence spécifique DUS (*DNA uptake sequence*) de 10 nucléotides sur l'ADN. Il est supposé que cette séquence est nécessaire pour une recombinaison homologue efficace (Treangen *et al.*, 2008).

b. Rôle de PilE

Il existe, chez le gonocoque, une modification post-traductionnelle de la piline qui serait impliquée dans la régulation de la compétence. Le gène codant PptA (*pptA* ou *dca*), est responsable du transfert de résidus phosphate sur la sérine 68 de la piline du gonocoque. Un mutant de ce gène est affecté dans sa capacité à être transformé (Snyder *et al.*, 2001). La présence de charges négatives tout au long du pilus pourrait être essentielle aux interactions électrostatiques entre l'ADN et le pilus. La mutation de ce gène n'a pas d'effet sur la compétence naturelle du méningocoque.

4. Motilité

Les Pt4 permettent une certaine forme de mobilité appelée « twitching motility ». Cette mobilité est caractérisée, pour une bactérie individuelle, par des mouvements courts, dirigés et changeant souvent de sens, ressemblant à un mouvement brownien (Henrichsen, 1972). Ce mouvement dépend de la rétraction des pili (pour revue (Wall and Kaiser, 1999). La « twitching motility » a été surtout étudiée chez *P. aeruginosa*, *Heomophilus influenzae*, *Myxococcus xanthus* ou chez les *Clostridia*. Le pilus se lie à un substrat, une seconde bactérie ou la membrane d'une cellule par exemple, et la rétraction permet le déplacement de la bactérie vers ce substrat. La fonction exacte de cette motilité n'est pas clairement établie, cependant il n'existe pas de mutants naturels exprimant des Pt4 et non motiles décrits dans la littérature. Cela suggère que cette fonction est peut-être essentielle au cycle de vie du méningocoque.

5. Transduction de signaux cellulaires

Les Pt4 ont été décrits chez les *Neisseria* comme capables d'induire des voies de signalisations eucaryotes mais leur rôle n'est pas toujours très clair. Ainsi il est montré que l'adhésion dépendant des pili est responsable de modifications d'expression de certains gènes sur cellules épithéliales et endothéliales mais le rôle direct des Pt4 n'est pas établi (Plant *et al.*, 2004; Plant and Jonsson, 2006).

L'adhésion des pili sur CD46 est suivie d'une phosphorylation du récepteur, cette phosphorylation participe à une voie de signalisation aboutissant à la libération de calcium intracellulaire (Kallstrom *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2002). Le rôle direct des pili dans l'activation de cette voie de signalisation est établi puisque l'ajout de pili purifiés à des cellules épithéliales en culture suffit à la déclencher.

Enfin le méningocoque est responsable d'une réorganisation complexe du cytosquelette d'actine décrite dans le chapitre suivant. Il a été suggéré que les Pt4 sont le vecteur déclencheur de cette réponse cellulaire (Merz *et al.*, 1999).

C. La cellule eucaryote face à la colonisation

Depuis quelques années, de nombreux groupes de recherche ont montré que des bactéries commensales ou pathogènes déclenchent parfois des voies de signalisation eucaryotes et que celles-ci ont des conséquences sur le mode de vie de ces bactéries. Ces découvertes se sont révélées si importantes et complexes qu'un nouveau domaine, consacré à ces interactions, a été créé : la Microbiologie Cellulaire. Comme la traduction littérale l'exprime mal, ce domaine s'intéresse aux interactions entre les microbes et les cellules eucaryotes. Il recouvre en particulier deux voies d'étude : la réponse naturelle, souvent immunitaire, de l'organisme hôte face à la présence d'un microbe et les mécanismes de survie de ce microbe, ou le détournement de mécanismes moléculaires de la cellule par un microbe à son propre profit.

En réponse à la colonisation par *N. meningitidis*, plusieurs phénomènes ont été décrits et déjà cités dans ce mémoire. Le méningocoque induit des modifications du profil d'expression génique des cellules hôtes. Ces modifications participent à la survie de la cellule et par conséquent à la survie de la bactérie. Les protéines Opa ou Opc activent certaines voies de signalisation permettant l'invasion des cellules. Les pili déclenchent une libération de calcium dans la cellule, ce qui semble participer à l'adhésion de la bactérie. Ces interactions font partie intégrante du mode de colonisation et de survie du méningocoque. A l'exception du rôle du calcium, le rôle et les mécanismes impliqués sont compris ou en voie de l'être.

Cependant, depuis quelques années, une interaction particulière entre les *Neisseria* pathogènes et les cellules hôtes a été décrite. L'adhésion de la bactérie s'accompagne d'un remodelage local de la membrane plasmique soutenue par une réorganisation complexe du cytosquelette d'actine. Les connaissances sur ce phénomène restent fragmentaires : les mécanismes moléculaires à l'origine de ce phénomène sont encore largement inconnus et les voies de signalisation eucaryotes modulées mal définies. Finalement, le seul rôle proposé pour ce phénomène est d'influencer l'internalisation des bactéries. De telles réorganisations du cytosquelette d'actine ont déjà été décrites chez d'autres pathogènes et sont essentielles dans leur cycle de vie. Il est donc envisageable que, comme pour ces bactéries, ce phénomène soit important dans le mode de vie de *Neisseria* au contact des cellules hôtes.

I. Modulation du cytosquelette d'actine par les pathogènes

Trois des pathogènes modèles pour les interactions entre bactéries et cellules hôtes sont *Listeria monocytogenes*, les *Shigella*, et les *E. coli* entéropathogènes (EPEC). Les mécanismes de ces interactions et leurs rôles découverts pour ces trois bactéries ont largement influencé les recherches et les hypothèses proposées dans l'étude de la réorganisation du cytosquelette d'actine induite par le méningocoque.

Ces trois pathogènes utilisent les voies de signalisation eucaryotes et le cytosquelette d'actine afin d'induire leur internalisation ou leur adhésion sur leur cellule hôte puis leur propagation. Pour cela, des mécanismes très différents ont été sélectionnés au cours de l'évolution.

1. Listeria

Pour *L. monocytogenes*, des protéines de surface de la famille des « internalines », se lient à des récepteurs membranaires eucaryotes (Bierne *et al.*, 2007). IlnA se lie aux E-cadherines et IlnB possède plusieurs récepteurs décrits dont le récepteur au facteur de croissance des hépatocytes Met/HGFR (Figure 14) (Schubert *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2000). La liaison de IlnA aux E-cadherines déclenche une activation de la kinase Src et le recrutement de la cortactine. La cortactine recrute et active le complexe de nucléation de l'actine : Arp2/3. IlnB se lie à Met et déclenche l'activation de la PI3 Kinase (PI3K) puis des petites GTPases Rac1 et Cdc42 nécessaires au recrutement et à l'activation de Arp2/3. Dans les deux cas, la polymérisation d'actine qui s'ensuit est nécessaire à l'internalisation de la bactérie (pour revue (Cossart and Toledo-Arana, 2008).

Une fois dans la vacuole d'endocytose, la bactérie est capable de lyser la membrane grâce à une enzyme nommée Listériolysine O (LLO).

Une fois dans le cytoplasme, pour se déplacer et se répandre d'une cellule à l'autre, *L. monocytogenes* utilise aussi le cytosquelette d'actine par un mécanisme spectaculaire. La bactérie exprime une protéine, ActA, exposée à la surface de l'un de ses pôles, cette protéine est capable de lier le complexe Arp2/3 qui nucléée alors l'actine (Figure 15) (Welch *et al.*, 1998). L'actine, en se polymérisant à un pôle de la bactérie, propulse celle-ci à travers le cytoplasme. Ce mouvement permet à la bactérie de rejoindre le cytoplasme d'une cellule adjacente et de disséminer de cellule à cellule. Cette polymérisation forme de longues queues d'actine à une extrémité de la bactérie, évoquant une comète. L'utilisation du cytosquelette d'actine par *L. monocytogenes* est donc essentielle dans son mode de colonisation des cellules eucaryotes puisqu'il permet l'internalisation et la transmission entre cellules.

Ces études sur *L. monocytogenes* ont permis d'établir deux paradigmes :

Le mécanisme « zipper », où une bactérie active des voies de signalisation depuis la surface cellulaire pour provoquer son internalisation.

L'utilisation du cytosquelette d'actine pour promouvoir la motilité bactérienne dans le cytoplasme.

2. *Shigella*

Pour les *Shigella* le mécanisme est différent. Ces bactéries expriment un système de sécrétion de type III (SST3) capable d'injecter des effecteurs moléculaires directement dans le cytoplasme de la cellule eucaryote (Figure 16) (pour revue (Schroeder and Hilbi, 2008)). L'adhésion de la bactérie dépend des protéines IpaB, IpaC et IpaD présentes à l'extrémité du système de sécrétion. Ces protéines se lient aux intégrines et au récepteur CD44 (Skoudy *et al.*, 2000; Watarai *et al.*, 1996). Ces interactions permettent alors la liaison de IpaB au cholestérol de la membrane plasmique eucaryote et l'intégration de l'extrémité du SST3 dans la membrane. La bactérie injecte ensuite plusieurs effecteurs protéiques, dont IpaC, qui active Rac1 et Cdc42 avec encore ici une activation de Arp2/3 et une polymérisation du cytosquelette d'actine (Tran Van Nhieu *et al.*, 1999). Dans le cas des *Shigella*, la polymérisation de l'actine dépend notamment de Rac1 et favorise la formation de lamellipodes autour des bactéries (Figure 17A). Ces lamellipodes se referment sur les bactéries et permettent leur internalisation. Les protéines IpaB/C/D sont également nécessaires pour la lyse de la vacuole d'endocytose. Une fois dans le cytoplasme, la bactérie

utilise un système similaire à *Listeria* pour se déplacer : une protéine IcsA (*Intracellular spread A*) localisée à un pôle de la bactérie recrute et active la protéine N-WASP connu pour recruter et activer elle-même Arp2/3 (Figure 15B) (Egile *et al.*, 1999; Nakagawa *et al.*, 2001). Comme pour *L. monocytogenes*, une comète d'actine se forme et propulse la bactérie à travers le cytoplasme. La subversion du cytosquelette d'actine joue, ici encore, un rôle essentiel dans le cycle de vie de la bactérie.

Dans ce cas particulier, la présence d'un système de sécrétion permet d'injecter des effecteurs moléculaires directement dans le cytoplasme cellulaire. C'est donc depuis l'intérieur de la cellule que les voies de signalisation sont modulées. Ce mécanisme d'internalisation de la bactérie a été baptisé « trigger ». Comme pour *L. monocytogenes*, le cytosquelette d'actine est également détourné pour permettre la motilité intracellulaire de la bactérie.

3. EPEC

Le cas des *E. coli* entéropathogènes, ou EPEC, est différent même si elles expriment également un SST3. L'adhésion des EPEC aux cellules épithéliales n'induit pas leur internalisation mais provoque localement la disparition des microvilli des cellules épithéliales remplacés par une structure membranaire soutenue par le cytosquelette d'actine et appelée « piédestal » (pour revues (Celli *et al.*, 2000; Frankel and Phillips, 2008). L'adhésion initiale de la bactérie est associée à l'expression d'adhésines comme les BFP (*Bundle-forming pili*). La bactérie injecte alors la protéine Tir dans le cytoplasme de la cellule hôte via son SST3. Cette protéine s'intègre dans la membrane plasmique et sert alors de récepteur à une protéine bactérienne appelé Intimine. Cela permet une seconde adhésion, plus robuste, de la bactérie. La protéine Tir peut être phosphorylée et recrute alors un adaptateur « Nck » (Figure 15B). Cet adaptateur se lie ensuite à N-WASP qui recrute Arp2/3 provoquant la polymérisation de l'actine. Il est à noter que ce mécanisme moléculaire n'a pas été observé *in vivo*.

Contrairement aux deux cas précédents, ce système ne provoque pas l'internalisation de la bactérie, mais il lui permet d'induire une adhésion robuste à la surface de la cellule hôte. La réorganisation locale du cytosquelette d'actine par les EPEC leur permet donc de coloniser la membrane de la cellule hôte.

Bien que les mécanismes moléculaires soient fondamentalement différents entre ces trois pathogènes, un point similaire est la modulation du cytosquelette d'actine de la cellule hôte par la prise de contrôle du complexe Arp2/3 en recrutant des protéines capables de l'activer : N-WASP, cortactine ou les petites GTPases Rho.

II. Réorganisation du cytosquelette d'actine induite par les *Neisseria*

Comme ces trois pathogènes, *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae* induisent une réorganisation complexe et locale du cytosquelette d'actine de la cellule hôte. Par homologie à *L. monocytogenes* et aux *Shigella*, il a été proposé que ce phénomène participe à l'internalisation de la bactérie. De même, le méningocoque ne possédant pas de système de sécrétion comparable aux *Shigella* ou aux EPEC, il est proposé que, comme chez *L. monocytogenes*, ce soient des molécules de surface qui déclenchent les voies de signalisation en activant directement des récepteurs cellulaires. Cependant, un rôle dans l'internalisation reste à démontrer et les molécules en question n'ont pas encore été découvertes. De plus, les informations restent fragmentaires sur les molécules et les voies de signalisations activées.

1. Remodelage de la membrane plasmique

Les observations en microscopie électronique à balayage décrivent depuis de nombreuses années un remodelage de la membrane plasmique sous, et à proximité des microcolonies de *N. meningitidis*. Les premières observations d'infection d'organes en culture décrivent un allongement des microvilli épithéliaux autour des bactéries (Stephens *et al.*, 1983). Cette observation a été faite également sur des cellules épithéliales en culture où les microvilli s'allongent et semblent plus nombreux sous les microcolonies (Figure 18A). Sur des cellules endothéliales en culture, dépourvues de microvilli, la présence de bactéries

s'accompagne de la formation de projections membranaires ressemblant à des microvilli ou à des filopodes (Figure 18B) (Eugene *et al.*, 2002). Il apparaît donc que la présence de *N. meningitidis* provoque soit une réorganisation des microvilli, soit une formation *de novo* de ceux-ci.

De telles structures ressemblent à celles observées dans le cas d'infections *in vitro* par *P. aeruginosa* ou encore par *Cryptosporidium parvum* (Gassama-Diagne *et al.*, 2006; Kierbel *et al.*, 2005; O'Hara *et al.*, 2008)). Dans le cas de ces deux bactéries, il a été montré que le remodelage de la membrane plasmique permettait l'invasion des cellules épithéliales.

Sur des cellules épithéliales, cette réorganisation est temporaire. En effet, après la mise en place de l'adhésion intime, les microvilli épithéliaux, même présents à l'origine, disparaissent.

2. La plaque corticale

En parallèle du remodelage de la membrane plasmique, plusieurs groupes ont décrit un recrutement significatif de protéines sous les microcolonies (Figure 19). Parmi les protéines décrites, plusieurs récepteurs membranaires : CD44, CD46, ICAM-1, ICAM-2, VCAM, les E-selectines et les récepteurs au facteur de croissance EGFR (dans le cas du gonocoque uniquement) et ErbB2 (Doulet *et al.*, 2006; Eugene *et al.*, 2002; Hoffmann *et al.*, 2001; Lambotin *et al.*, 2005; Merz *et al.*, 1999; Weyand *et al.*, 2006). La présence de récepteurs phosphorylés sur tyrosine est décrite dans les plaques corticales (Merz and So, 1997). Parmi les récepteurs identifiés, ErbB2 et CD46, sont connus pour être phosphorylés sur des tyrosines en réponse à la colonisation par les bactéries (Hoffmann *et al.*, 2001; Weyand *et al.*, 2006).

Ce recrutement prend une forme particulière puisque ces différentes protéines ne sont pas localisées sous les bactéries mais autour. Elles forment alors une structure alvéolaire ressemblant à des « nids d'abeille ». Comme elles sont localisées au niveau du cortex de la cellule ces structures ont été baptisées « plaques corticales ». Le recrutement de ces protéines n'est pas encore compris mais il est associé directement à la formation des projections membranaires puisque ces deux phénomènes sont toujours observés de façon concomitante. En effet, l'inhibition de la formation des plaques corticales est associée à la perte des microvilli (Eugene *et al.*, 2002).

Des travaux sur ErbB2 ont montré que sa présence n'est pas indispensable à la formation de la plaque corticale (Hoffmann *et al.*, 2001). Il est donc possible que plusieurs des récepteurs recrutés dans les plaques corticales ne soient pas indispensables non plus. La formation de clusters de récepteurs membranaires évoque des structures particulières appelées « radeaux lipidiques » (*lipid rafts*) (pour revue (Simons and Toomre, 2000)). Ces microdomaines membranaires, riches en lipides particuliers comme le cholestérol ou certains sphingolipides, permettent de concentrer localement des récepteurs et leurs co-récepteurs. Cela favorise ainsi certaines voies de signalisation. De manière intéressante, à l'exception de CD46, tous les récepteurs recrutés dans les plaques corticales ont déjà été localisés dans ces structures. Chez les *Shigella*, les EPEC, *Listeria* et *Cryptosporidium*, ces radeaux lipidiques ont été décrits comme essentiels à la transduction des signaux cellulaires permettant de moduler le cytosquelette d'actine (Lafont *et al.*, 2004; Lafont and van der Goot, 2005; O'Hara *et al.*, 2008). Un tel rôle des radeaux lipidiques reste à démontrer chez *N. meningitidis*.

3. De la plaque corticale à l'actine : les ERM

Les travaux de E. Eugène et A.J. Merz et collaborateurs, décrivent des intervenants essentiels de ces plaques corticales : Ezrine (Figure 19) et Moesine (Eugene *et al.*, 2002; Merz *et al.*, 1999). Ces protéines appartiennent à la famille des ERM (*Ezrin Radixin Moesin*). Les ERM sont des protéines permettant de faire le lien entre certains récepteurs membranaires et l'actine.

Les ERM sont localisées dans le cytoplasme sous forme repliée inactive. Lorsqu'un récepteur membranaire est activé, la liaison des ERM au PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5 - Bisphosphate) et aux petites GTPase Rho permet la phosphorylation de la protéine. Cette phosphorylation permet l'ouverture de la protéine. Elle peut alors interagir avec l'actine via son domaine C-terminal. Le domaine N-terminal (FERM) de la protéine peut se lier à un récepteur membranaire directement ou par l'intermédiaire d'un adaptateur, ou à la PI3K (pour revue (Niggli and Rossy, 2008)). Il existe une spécificité tissulaire d'expression des ERM. Il a été montré que les ERM recrutées dans les plaques corticales sont phosphorylées, donc activées (Weyand *et al.*, 2006).

La première description de l'eitrine a montré sa localisation dans les microvilli des cellules épithéliales. Son absence entraîne une incapacité de la cellule à former des microvilli

normaux démontrant son rôle essentiel dans l'établissement de ces structures. Le rôle de l'eitrine dans la réorganisation du cytosquelette d'actine induite par *N. meningitidis* n'est pas encore compris mais son intervention est nécessaire au recrutement de la plaque corticale et à la formation de projections membranaires (Eugene *et al.*, 2002). Cette protéine joue donc un rôle clef dans la réorganisation du cytosquelette d'actine. L'eitrine joue également un rôle dans le cycle de vie d'autres pathogènes. Sa présence est indispensable à l'internalisation de *Shigella* dans les cellules épithéliales (Skoudy *et al.*, 1999).

4. Recrutement et polymérisation de l'actine

Les derniers intervenants décrits pour être recrutés sous les microcolonies de méningocoque sont les protéines du cytosquelette d'actine. Un recrutement important d'actine et de cortactine est observable dans les plaques corticales (Figure 19) (Merz *et al.*, 1999). Comme le récepteur qui déclenche la réorganisation du cytosquelette n'est pas connu, la séquence d'événements aboutissant à la polymérisation de l'actine autour des bactéries reste obscure. Cependant, il a été montré que, comme pour la formation des microvillosités induite par *Cryptosporidium*, le recrutement d'actine nécessite l'activation des voies de signalisation dépendantes de petites GTPases RhoA et Cdc42 en aval du recrutement de l'eitrine (Figure 17B) (Chen *et al.*, 2004; Eugene *et al.*, 2002).

En parallèle, deux voies de signalisation ont été décrites (Figure 20) : l'une dépendant de la présence du LOS de la bactérie, l'autre dépendant du récepteur ErbB2. Dans la première voie, la présence de LOS (immunotype lacto-N-neotetraose) déclenche l'activation de la PI3K puis de la GTPase Rac1. Cela permet le recrutement de cortactine sous les microcolonies (Lambotin *et al.*, 2005). La cortactine lie le complexe Arp2/3 qui suffit à nucléer l'actine. La seconde voie dépend de ErbB2, ce co-récepteur des récepteurs à l'EGF est dimérisé et activé par phosphorylation dans les plaques corticales. Cela active la kinase Src qui phosphoryle alors la cortactine sur tyrosine, favorisant la polymérisation d'actine (Hoffmann *et al.*, 2001). Ces voies sont indépendantes des petites GTPases RhoA et Cdc42 pourtant essentielles au recrutement d'actine, il est donc proposé qu'elles amplifient le recrutement d'actine plutôt que de déclencher sa polymérisation.

La présence d'ezrine, le recrutement et la polymérisation d'actine, notamment sous l'action des GTPase RhoA et Cdc42, sont essentiels à la formation des microvillosités. Tous ces événements participent donc à un même phénomène.

5. Induction et conséquences de la réponse cellulaire

L'infection de cellules épithéliales en culture par des méningocoques tués, par la chaleur ou par l'action d'un antibiotique, ne déclenche pas le recrutement de la plaque corticale. Cela suggère que c'est la bactérie vivante qui déclenche cette réorganisation du cytosquelette et non une réponse non spécifique de la cellule à un corps étranger (Merz and So, 1997). De plus, la comparaison avec les autres bactéries pathogènes suggère que l'induction de la réorganisation du cytosquelette d'actine présente un « intérêt » pour la bactérie, peut-être dans son cycle de vie. Deux questions se posent alors : comment la bactérie déclenche ces voies de signalisation et quelles en sont les conséquences sur son cycle de vie ? Au niveau expérimental, ces deux questions sont intimement liées puisqu'il est difficile de tester les conséquences d'un phénomène que l'on ne sait pas moduler.

a. Induction de la réponse cellulaire

Le méningocoque ne possède pas de système de sécrétion comparable à *Shigella* ou aux EPEC, ce sont donc des molécules de surfaces qui sont impliquées dans le déclenchement de la réorganisation du cytosquelette d'actine. A ce jour plusieurs structures ont été impliquées : les protéines Opa, le LOS et les Pt4.

Le LOS participe à l'activation d'une voie de signalisation secondaire. Ce n'est donc pas l'inducteur initial (Lambotin *et al.*, 2005).

Les protéines Opa sont connues pour déclencher une polymérisation locale d'actine. Cette polymérisation dépend de l'activation de petites GTPases Rho et permet l'internalisation. Cependant les travaux de A.J. Merz et coll. montrent que cette réorganisation du cytosquelette d'actine est indépendante du phénomène décrit précédemment (Merz and So, 1997; Merz *et al.*, 1999). Des bactéries Opa- Pili+ et Opa+Pili- déclenchent toutes deux un recrutement d'actine mais seules les bactéries avec des pili recrutent la plaque corticale. Il apparaît donc

qu'il existe deux mécanismes moléculaires indépendants malgré des phénotypes similaires au niveau de la polymérisation d'actine.

Ces travaux soutiennent également la possibilité que les Pt4 soient le vecteur du déclenchement de la réorganisation du cytosquelette d'actine.

De plus, des travaux menés chez *N. gonorrhoeae* montrent que la rétraction des Pt4 dépendante de PilT, participe à l'activation de la PI3K et à la production de PIP3 sous les microcolonies. Ces travaux suggèrent donc une implication des Pt4 dans l'induction de la réponse cellulaire. Cependant, celle-ci pourrait être indirecte, par une voie de mécano-transduction (Lee *et al.*, 2005b).

Enfin, l'adhésion des Pt4 a été associée à une libération de calcium intracellulaire. Ce phénomène a été relié à la phosphorylation de CD46 dans les plaques corticales. Il n'est pas exclu que ces deux voies de signalisation soient associées.

b. Conséquences de la réponse cellulaire

Par homologie à *Listeria* et *Shigella*, il a été proposé que ce mécanisme participe à l'internalisation de la bactérie (Eugene *et al.*, 2002; Hoffmann *et al.*, 2001; Lambotin *et al.*, 2005). Il semble en effet que l'inhibition du recrutement d'actine se traduit par une réduction de l'internalisation du méningocoque. De manière intéressante, le recrutement de la plaque corticale n'est pas impliqué dans cette internalisation, seule la polymérisation d'actine qui en découle est nécessaire.

Dans ces études, il n'est malgré tout pas exclu que ce phénomène soit lié à la présence d'une sous population de bactéries exprimant certaines protéines Opa, connues pour provoquer l'internalisation par des mécanismes dépendants également de l'actine. Il est donc difficile de conclure sur ce point.

Une question demeure pourtant, l'internalisation de *N. meningitidis* dans les cellules humaines est un phénomène rare qui n'intervient que pour une bactérie sur 1.000 ou 10.000. La réorganisation du cytosquelette d'actine et la formation de projections membranaires concomitante est un phénomène extrêmement fréquent, observable pour près de 90% des microcolonies bactériennes présentes sur les cellules. Il est donc probable que ce phénomène a d'autres conséquences sur le mode de vie de *N. meningitidis*. Cette question reste ouverte.

D. La colonisation dans le contexte circulatoire

Depuis une dizaine d'années, des études de plus en plus nombreuses ont montré l'importance de l'impact des forces hydrodynamiques sur le comportement des cellules dans les systèmes circulatoires. Ces forces sont à prendre en compte puisqu'elles s'exercent en particulier sur les bactéries pathogènes ou commensales qui colonisent leur hôte. La colonisation du corps humain par des bactéries se fait dans le contexte particulier et local de flux de liquides : flux de mucus dans la gorge et le système digestif, d'urine dans les voies uro-génitales ou de lymphes et de sang dans la circulation générale. La colonisation des cellules eucaryotes par le méningocoque se fait donc dans le contexte d'un flux de mucus dans son cycle commensal et du flux sanguin pendant la pathogenèse.

I. Les contraintes de cisaillement

1. Définition

Les forces s'exerçant sur un objet dans un liquide dépendent des forces hydrodynamiques générées par le liquide en question. La caractérisation de ces forces dépend de nombreux paramètres dont la viscosité du liquide, sa vitesse, son débit, son état d'écoulement laminaire ou turbulent ainsi que du système dans lequel s'écoule ce liquide (tube, plan, etc.) (pour revue (Guyon, 2001)). L'étude des forces hydrodynamiques en biologie s'est intéressée, en particulier, aux systèmes circulatoires sanguin et urinaire (Kohl, 2005; Severac *et al.*, 2007). Dans ce contexte, les forces sont modélisées en appliquant les lois de l'hydrodynamique décrites par Bernoulli, Reynolds ou Poiseuille en considérant que le sang a généralement un écoulement laminaire (Figure 21). La vitesse d'un liquide dans un tube rigide n'est pas identique en tout point de celui-ci. Les forces de frottement exercées par la paroi ralentissent le liquide. Ce ralentissement est propagé par couches jusqu'au centre du tube où la vitesse est maximale. Pour contrecarrer les forces de frottement exercées par la

paroi, le liquide exerce des forces ou contraintes dites de cisaillement sur cette paroi. Ces forces de cisaillement s'appliquent également entre chaque « couche » de liquide.

La loi de Poiseuille permet de calculer les contraintes de cisaillement au contact de la paroi par l'équation : $T=4\mu Q/\pi R^3$ où μ est la viscosité du liquide, Q son débit, et R le rayon du tube. Comme dans un tube le débit se calcule par l'équation $Q=VS=V\pi R^2$ (où S est la surface de la section de tube et V la vitesse du liquide), alors la première équation se simplifie par $T=4\mu V/R$ exprimé en dynes/cm² ou en Newton/m² (1 N = 10⁵ dynes). Les forces hydrodynamiques qui s'exercent alors sur un objet sphérique de rayon r sont fonctions de ces contraintes de cisaillement et de la taille de l'objet suivant l'équation : $F=32Tr^2$. La difficulté est alors que les objets naturels sont rarement parfaitement sphériques et que les contraintes de cisaillement dépendent de la position de l'objet dans le tube. Cependant ces équations sont tout à fait appropriées pour étudier l'adhésion d'un objet sur les parois d'un tube. Pour simplifier la quantification et pour comparer les valeurs entre les différentes études, on utilise généralement les contraintes de cisaillement plutôt que la valeur des forces hydrodynamiques (Pierres *et al.*, 1996).

2. Mesures

Dans le cas du méningocoque, nous nous intéressons aux contraintes de cisaillement appliquées le long de la gorge par le mucus et par le sang dans les vaisseaux.

Pour la circulation sanguine, de nombreuses équipes se sont intéressées aux valeurs des contraintes de cisaillement dans les différents types de vaisseaux sanguins chez l'Homme (Cheng *et al.*, 2003; Gnasso *et al.*, 1997; Irace *et al.*, 2004; Malek *et al.*, 1999; Ohkubo *et al.*, 2007; Oyre *et al.*, 1997; Oyre *et al.*, 1998; Pries *et al.*, 1994). En utilisant des techniques d'imagerie comme la sonographie Doppler ou l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) il est possible d'établir une carte des contraintes de cisaillement dans les différents types de vaisseaux sanguins (Figure 22). Ces contraintes varient selon la taille des vaisseaux et le type de système sanguin considéré. Les contraintes de cisaillement varient de 3 à 54 dynes/cm² dans le système artériel. Il est particulièrement important dans les artères coronaire et cérébrale où il dépasse les 30 dynes/cm². Ces contraintes sont plus faibles, de 1 à 6 dynes/cm², dans le système veineux. Une étude de la microcirculation dans la rétine a permis d'estimer les contraintes de cisaillement autour de 54 dynes/cm² dans les artérioles et 24 dynes/cm² dans

les veinules (Nagaoka and Yoshida, 2006). Malheureusement les valeurs fiables manquent chez l'homme pour le réseau capillaire, trop fin pour être étudié par ces méthodes classiques. Cependant, l'étude d'Emilie Mairey s'est appuyée sur une analyse de la microcirculation cérébrale chez le rat et a pu déterminer que les forces de cisaillement dans les capillaires cérébraux sanguins variaient de 0 dynes/cm², pendant des arrêts momentanés de la circulation, à plus de 30 dynes/cm² (Mairey *et al.*, 2006). (Pour comparaison, à l'échelle d'une bactérie (μm²) : 10 dynes/cm² représentent 1pN/μm². En comparaison, les Pt4 exercent des forces de rétraction de l'ordre de 100 pN par pilus.)

Pour le mucus, l'étude est différente puisque celui-ci ne se déverse pas dans un tube et que sa composition varie localement. Les contraintes de cisaillement ont été estimées à plus de 10 dynes/cm² dans le tractus respiratoire supérieur où le mucus est très visqueux. Cependant, celui-ci ne dépasserait pas 0,1 dynes/cm² dans le nasopharynx. Ces valeurs peuvent varier localement en fonction de la composition du mucus, du nombre de cellules ciliées, responsables du flux, et de l'état du tractus respiratoire (pour revue (Lai *et al.*, 2009).

II. Effet des forces hydrodynamiques sur les cellules de l'hôte

1. Physiologie des cellules des vaisseaux

Les contraintes de cisaillement s'appliquent en premier lieu sur les cellules des différents systèmes circulatoires. Il a été montré qu'un flux de liquide peut influencer significativement la physiologie de ces cellules (pour revue (Davies, 1995). La première observation est que l'application prolongée d'un flux laminaire fort, supérieur à 10 dynes/cm², induit un changement de morphologie des cellules, soutenu par une réorganisation du cytosquelette d'actine dépendant de Cdc42 (Lee *et al.*, 2005a; Noria *et al.*, 2004; Osborn *et al.*, 2006; Simmers *et al.*, 2007). Les cellules tendent à s'allonger dans le sens du flux et des câbles de stress d'actine se forment parallèlement à la cellule (Figure 23). Ces changements n'apparaissent pas pour des flux trop faibles ou turbulents.

Ensuite, de nombreuses études montrent que le profil d'expression génique des cellules est différent quand les cellules sont cultivées sous un flux constant (McCormick *et al.*, 2001; Topper and Gimbrone, 1999). Cette régulation différentielle des gènes dépend de la présence

de récepteurs sensibles à la pression, parmi lesquels des canaux ioniques, les Intégrines ou des récepteurs couplés à des protéines G ou à activité tyrosine kinase (Lehoux *et al.*, 2002; Lemarie *et al.*, 2003). Un corollaire de cette dérégulation des gènes, est que ces cellules vont se comporter différemment. Cela a été montré dans le cas de la sensibilité au TNF α de cellules endothéliales cérébrales. Lors de l'inflammation, le TNF α induit l'expression des Selectines et de ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales. L'application d'un flux laminaire constant sur des cultures de cellules module cette réponse. En réponse au TNF α , les cellules ne sont plus capables d'induire l'expression des Selectines tandis que l'expression de ICAM-1 augmente (Chiu *et al.*, 2004; Gaucher *et al.*, 2007; Nagel *et al.*, 1994; Sheikh *et al.*, 2003).

Ces résultats soulèvent la question de la validité des études menées sur des cellules endothéliales vasculaires en condition statique.

2. Comportement des leucocytes

Dans la circulation sanguine, certaines cellules interagissent avec les parois des vaisseaux malgré la présence de forces hydrodynamiques, ou contraintes de cisaillement, importantes. Par exemple, les leucocytes dont le rôle est de « patrouiller » le long des vaisseaux à la « recherche » d'un site d'inflammation.

L'intuition et les théories de la thermodynamique, appliqués à l'interaction ligand/récepteur laissent penser que cette interaction sera déstabilisée par un flux de liquide. Une telle interaction a une durée de vie statistique intrinsèque qui dépend de l'énergie nécessaire pour la rompre ; cette énergie définit la stabilité de la liaison. L'apport extérieur d'énergie, par exemple via un flux de liquide, réduit donc la stabilité de l'interaction. En théorie la stabilité des interactions ligand/récepteur sera donc inversement proportionnelle à la force exercée par le liquide. Il existe pourtant un type d'interaction qui contredit cette théorie. Ces interactions, d'abord postulées puis démontrées dans le cas des leucocytes, sont en fait transitoirement stabilisées par l'exercice de forces extérieures (Dembo *et al.*, 1988; Lawrence and Springer, 1991; Marshall *et al.*, 2003). Ces interactions ont été appelées « catch bonds » ou « liaisons accrocheuses », par opposition aux « slip bonds » ou « liaisons glissantes » qui ont les caractéristiques que l'intuition attend d'une interaction moléculaire (Figure 24) (pour revue (Pierres *et al.*, 2003).

Dans le cas des leucocytes, les cellules emportées dans le flux, sont capables d'établir des liaisons de type « catch bonds ». Les récepteurs de la famille des Selectines (E-selectine ou P-selectine) établissent ces liaisons avec leurs ligands à la surface des cellules endothéliales (Lawrence and Springer, 1993; McEver, 2002). Ces interactions sont quasiment inexistantes en condition statique, mais très efficaces si une force est exercée sur les molécules (Finger *et al.*, 1996; Lawrence *et al.*, 1997). Elles sont donc parfaitement adaptées aux conditions hydrodynamiques de la circulation sanguine.

Les leucocytes « roulent » alors sur la paroi des vaisseaux sanguins ; ce déplacement est suffisamment lent et la proximité avec la paroi vasculaire suffisamment étroite, pour permettre d'autres interactions ligand/récepteurs. Si des cellules endothéliales expriment des récepteurs induits lors d'une inflammation, de nouvelles interactions entre les leucocytes et les cellules s'établissent, les leucocytes s'arrêtent alors et migrent à travers la paroi du vaisseau vers le site de l'inflammation.

III. Effet des forces de cisaillement sur les bactéries pathogènes

Les forces hydrodynamiques s'appliquent sur tout objet présent dans la circulation considérée. Elles s'appliquent donc sur les bactéries lors de la colonisation de leur niche écologique ou pendant leur pathogénèse. La colonisation des cellules est donc adaptée à ces propriétés hydrodynamiques.

1. Escherichia coli Uropathogènes

Dans le cas des *E. coli* uropathogènes (UPEC), des liaisons de type « catch bonds » expliquent la colonisation du tractus uro-génital. Les UPEC colonisent soit la muqueuse intestinale soit le tractus uro-génital. Les UPEC adhèrent aux cellules épithéliales grâce à leur Pili de type I, plus précisément via FimH localisée à l'apex du Pilus (Capitani *et al.*, 2006). FimH exhibe un domaine lectine capable de lier les résidus D-mannose présents sur les glycoprotéines exposées sur les cellules eucaryotes (Krogfelt *et al.*, 1990). Il existe différents

allèles de FimH dont les propriétés adhésives varient (Sokurenko *et al.*, 1994; Sokurenko *et al.*, 1995). Il a été montré que les variants hypo-adhérents de FimH sont plus efficaces pour coloniser l'intestin et les variants hyper-adhérents pour coloniser le tractus uro-génital (Sokurenko *et al.*, 1997).

Des travaux ont expliqué cette capacité colonisatrice en montrant que FimH met en place une adhésion de type « catch bonds » (Thomas *et al.*, 2004). En premier lieu la capacité à résister à des flux plus importants est sélectionnée dans les voies urinaires. Cependant, elle est peu compétitive dans l'intestin où les flux sont plus faibles. Les interactions « catch bonds » sont robustes en condition de flux mais fragiles si le flux est faible. Cela permet aux bactéries de se détacher, de rouler sur la muqueuse, puis de coloniser de nouveaux sites. Le spectre de forces affectant les adhésines dépend de l'allèle de FimH exprimé. Ainsi les allèles « faibles » de FimH ont des propriétés adhésives adaptées aux conditions hydrodynamiques de l'intestin et sont donc optimaux pour coloniser cette niche tandis que les allèles « forts » sont plus efficaces dans les conditions du tractus uro-génital.

Ces bactéries se sont donc adaptées aux conditions hydrodynamiques présentes dans leur environnement naturel. Cette adaptation explique le tropisme particulier des UPEC pour les muqueuses intestinale ou uro-génitale.

2. *Neisseria meningitidis*

Qu'en est-il pour *N. meningitidis* ? Cette bactérie doit adhérer à la muqueuse nasopharyngée en présence d'un flux de mucus et aux vaisseaux dans le flux sanguin. Cela suppose qu'elle s'est probablement adaptée à ces conditions pour coloniser efficacement sa niche écologique.

Pour étudier l'adaptation du méningocoque aux vaisseaux sanguins, Emilie Mairey a mis au point une chambre à flux laminaire pour tester l'adhésion du méningocoque sur cellules endothéliales vasculaires en condition de flux (Figure 25A) (Mairey *et al.*, 2006; Mairey, 2007). Ces conditions miment celles mesurées dans la circulation sanguine. Cette étude a révélé qu'en présence de capsule, seuls les Pt4 sont capables de permettre l'adhésion dans ces conditions. Cela démontre, encore une fois, le rôle essentiel de ces organelles dans la colonisation. Cependant, les Pt4 montrent les caractéristiques d'une adhésion de type « slip bonds » très sensibles aux contraintes mécaniques imposées par le flux (Figure 25B).

L'adhésion n'est permise qu'à des flux inférieurs à 0,5 dynes/cm² et est optimale en dessous de 0,05 dynes/cm². Ces flux correspondent effectivement à ceux estimés dans le nasopharynx. Dans la circulation sanguine, de tels flux ne sont retrouvés que dans les capillaires sanguins où la circulation peut s'arrêter transitoirement. Ce travail a permis d'expliquer le tropisme particulier du méningocoque pour les capillaires sanguins, en particulier cérébraux, observés *in vivo*. Contrairement aux présupposés, ce n'est probablement pas l'expression de récepteurs spécifiques sur certains tissus, mais les caractéristiques de la circulation sanguine et de l'adhésivité des Pt4 qui permettent la colonisation de ces tissus.

Pourtant ces travaux ont également montré que après cette première étape, les bactéries sont capables de résister à des flux beaucoup plus importants, supérieurs à 40 dynes/cm², sans se décrocher des cellules (Figure 25C). Dans ces conditions, les bactéries se divisent et forment des microcolonies comparables à celles observées en conditions statiques classiquement étudiées. Ces microcolonies résistent tout aussi efficacement aux forces de cisaillement exercées par le flux. Cela explique que les bactéries supportent alors les flux présents dans les capillaires après ces arrêts courts de la circulation.

Ces résultats posent également de nouvelles questions en ce qui concerne l'adhésion secondaire robuste du méningocoque et les mécanismes moléculaires qui assurent cette robustesse. En particulier, comme les forces s'exerçant sur un objet dans un flux sont proportionnelles au carré du rayon de cet objet ($F=32\eta r^2$), comment les microcolonies résistent-elles aux forces de cisaillement alors que celles-ci augmentent exponentiellement par rapport à la croissance de la colonie ?

II. OBJECTIFS

Dans les cycles de vie commensale et pathogène de *N. meningitidis*, la colonisation est une étape essentielle. Elle permet à la bactérie d'adhérer et d'envahir sa niche écologique pour ensuite se transmettre à un nouvel hôte. Elle précède le franchissement des deux barrières cellulaires, nasopharyngée et hémato-encéphalique, et la dissémination de la bactérie dans le corps humain. Les différentes étapes de la colonisation des cellules humaines par le méningocoque ont donc été largement étudiées par le passé et le rôle de nombreuses molécules a été décrypté. Cependant, en l'absence de modèle animal mimant ces étapes de colonisation chez l'homme, certains aspects n'ont pas pu être étudiés et le rôle précis de certaines molécules n'est toujours pas compris.

La colonisation d'une cellule eucaryote par une bactérie est un processus complexe intégrant plusieurs aspects essentiels : les propriétés intrinsèques de la bactérie en terme d'adhésion, d'agrégation, et de multiplication, mais également celles de la cellule comme par exemple l'expression de certains récepteurs. Il est aujourd'hui établi que l'interaction entre la cellule et la bactérie peut s'accompagner de phénomènes moléculaires complexes, comme ceux concernant le cytosquelette d'actine, qui peuvent participer à la colonisation. Enfin, les travaux menés sur les UPEC ont déjà pointé le rôle majeur des conditions hydrodynamiques dans la colonisation de leurs niches écologiques par ces bactéries.

Jusqu'ici, l'adhésion et la colonisation du méningocoque étaient étudiées en infectant des cellules humaines en culture dans des conditions statiques. Les différentes étapes (adhésion, prolifération, cohésion des microcolonies, etc.) ne sont que rarement dissociées et ces conditions ne miment pas les conditions hydrodynamiques naturelles dans lesquelles la colonisation a lieu. Les travaux de thèse d'Emilie Mairey ont démontré que l'intégration des forces hydrodynamiques présentes dans l'environnement naturel apporte des informations nouvelles et fondamentales dans la compréhension de la colonisation par la bactérie (Mairey, 2007). Elle pose également de nouvelles questions. L'intégration de ces forces hydrodynamiques peut donc nous permettre de mieux appréhender la colonisation et peut-être de répondre à des questions non élucidées sur le rôle précis de certaines molécules déjà connues.

Durant ma thèse, je me suis intéressé aux différents aspects de l'interaction entre le méningocoque et les cellules humaines afin de mieux comprendre cette étape essentielle du cycle de la bactérie et de proposer un modèle plus précis de la colonisation. Je me suis particulièrement intéressé au rôle de la réorganisation du cytosquelette d'actine dans le cycle de vie du méningocoque. Il paraît peu probable que des outils moléculaires aient été sélectionnés pour induire une telle réponse cellulaire avec comme seule conséquence de

promouvoir l'internalisation d'une sous fraction de la population bactérienne. Quelle est la fonction de cette interaction entre la bactérie et son hôte ? Comment le méningocoque déclenche-t-il cette réorganisation du cytosquelette ? Ce seront les deux questions centrales de ma thèse.

En parallèle de ces travaux, j'ai eu l'occasion de participer à une caractérisation exhaustive des modifications post-traductionnelles de la piline Pile dans notre souche d'étude. En particulier, j'ai étudié le rôle de ces modifications dans la colonisation et/ou la réorganisation du cytosquelette d'actine des cellules humaines.

Par ailleurs, comme cela a été évoqué, la voie de franchissement de la BHE par le méningocoque n'est toujours pas élucidée. Cependant, que ce soit par transcytose ou paracytose, la réorganisation du cytosquelette d'actine est pointée du doigt. J'ai eu l'opportunité de participer à une étude sur le sujet qui a permis d'apporter des éléments de réponse décisifs à cette question.

III. RESULTATS

A. Neisseria meningitidis induit un remodelage de la membrane plasmique pour résister aux forces de cisaillement

La première partie des résultats obtenus pendant ma thèse a fait l'objet d'une publication scientifique. Ce travail est résumé ici, en préambule de l'article.

Les travaux d'Emilie Mairey, au laboratoire, ont mis en évidence le comportement des bactéries pendant la colonisation des capillaires cérébraux sous l'action de forces de cisaillement comparables à celles générées par le flux sanguin (Mairey *et al.*, 2006). Ce flux influence directement la colonisation puisqu'il inhibe fortement l'adhésion initiale des bactéries. Cependant, après cette étape d'adhésion initiale, une bactérie est capable de résister à des forces de cisaillement jusqu'à 100 fois supérieures sans se décrocher sensiblement. Dans ces conditions, la bactérie se divise jusqu'à former des microcolonies compactes de plusieurs centaines d'individus à la surface des cellules. Ces microcolonies envahissent progressivement les vaisseaux en résistant toujours aux forces hydrodynamiques générées par le flux (Figure article 1). Les équations décrivant les forces auxquelles sont soumis des objets dans un flux laminaire nous apprennent que ces forces sont proportionnelles au carré du rayon de l'objet étudié. En conséquence, ces forces augmenteront de manière exponentielle par rapport à la croissance de la colonie, jusqu'à atteindre des valeurs qu'une bactérie seule ne pourrait pas supporter sans se décrocher. Nous avons cherché à comprendre comment ces microcolonies résistent à de telles forces et les mécanismes moléculaires sous-jacents.

Pour comprendre comment des microcolonies supportent de telles forces, il faut imaginer qu'une microcolonie forme un objet cohésif et robuste et que l'adhésion aux cellules de l'hôte est répartie entre plusieurs bactéries. Cependant, nous avons montré que les propriétés d'agrégation intrinsèques des bactéries sont trop fragiles pour résister aux forces hydrodynamiques, invalidant ainsi cette hypothèse (Figure article 2).

Lorsque les bactéries forment des microcolonies à la surface des cellules, il existe un autre facteur qui participe à la résistance des colonies : la cellule eucaryote. *N. meningitidis* induit une réorganisation de la membrane plasmique caractérisée par la formation de projections

membranaires autour des bactéries. Une étude pharmacologique nous a permis de montrer que l'inhibition de cette réorganisation de la membrane plasmique se traduisait par une perte de la capacité des microcolonies à résister aux forces de cisaillement importantes (Figures article 3, 4 et 5). Dans ces conditions, seules les bactéries en contact intime avec la membrane plasmique de la cellule hôte résistent aux forces tandis que les bactéries des couches supérieures de la colonie sont emportées par le flux.

Nous avons ensuite confirmé le rôle du remodelage de la membrane dans la résistance des microcolonies par une approche génétique sur la bactérie. La protéine PilV, probablement intégrée aux Pt4 du méningocoque, joue un rôle essentiel dans l'induction du remodelage de la membrane (Figure article 6). L'absence de la protéine PilV se traduit par une réduction drastique et simultanée de la capacité des microcolonies à remodeler la membrane et à résister aux forces mécaniques (Figures article 6 et 7). Comme précédemment, les bactéries des couches supérieures des microcolonies sont emportées par le flux de liquide.

Cette étude nous a permis de proposer un nouveau modèle de colonisation des cellules eucaryotes par *N. meningitidis*. Comme les agrégats bactériens sont peu résistants aux contraintes physiques, ils sont probablement peu représentés dans l'environnement naturel de la bactérie. Une bactérie individuelle adhère donc aux cellules de l'hôte en présence d'un flux très faible de mucus ou de sang. Cette bactérie supporte alors les variations de flux et les contraintes de cisaillement, elle se multiplie et forme une microcolonie. Cette colonie bactérienne est peu résistante ; seule l'adhésion directe à la membrane cellulaire permet d'établir des liaisons fortes. Dans le même temps, grâce à leur Pt4, les bactéries déclenchent des voies de signalisation eucaryotes qui aboutissent à la formation de filopodes autour des bactéries. Ces filopodes permettent à un nombre plus important de bactéries au sein de la colonie d'établir des liaisons fortes avec la membrane plasmique (Figure article 8). Cette colonisation nécessite donc la participation de la cellule eucaryote. Nous proposons le terme de « colonisation concertée » pour décrire ce phénomène.

Extracellular Bacterial Pathogen Induces Host Cell Surface Reorganization to Resist Shear Stress

Guillain Mikaty^{1,2}, Magali Soyer^{1,2}, Emilie Mairey^{1,2}, Nelly Henry³, Dave Dyer⁴, Katrina T. Forest⁴, Philippe Morand^{1,2}, Stéphanie Guadagnini⁵, Marie Christine Prévost⁵, Xavier Nassif^{1,2,6}, Guillaume Duménil^{1,2*}

1 INSERM, U570, Paris, France, **2** Université Paris Descartes, Faculté de Médecine Paris Descartes, UMR S570, Paris, France, **3** CNRS, UMR 168, Paris, France, **4** University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology, Madison, Wisconsin, United States of America, **5** Plate-Forme de Microscopie Electronique, Institut Pasteur, Paris, France, **6** AP-HP, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France

Abstract

Bacterial infections targeting the bloodstream lead to a wide array of devastating diseases such as septic shock and meningitis. To study this crucial type of infection, its specific environment needs to be taken into account, in particular the mechanical forces generated by the blood flow. In a previous study using *Neisseria meningitidis* as a model, we observed that bacterial microcolonies forming on the endothelial cell surface in the vessel lumen are remarkably resistant to mechanical stress. The present study aims to identify the molecular basis of this resistance. *N. meningitidis* forms aggregates independently of host cells, yet we demonstrate here that cohesive forces involved in these bacterial aggregates are not sufficient to explain the stability of colonies on cell surfaces. Results imply that host cell attributes enhance microcolony cohesion. Microcolonies on the cell surface induce a cellular response consisting of numerous cellular protrusions similar to filopodia that come in close contact with all the bacteria in the microcolony. Consistent with a role of this cellular response, host cell lipid microdomain disruption simultaneously inhibited this response and rendered microcolonies sensitive to blood flow-generated drag forces. We then identified, by a genetic approach, the type IV pili component PilV as a triggering factor of plasma membrane reorganization, and consistently found that microcolonies formed by a *pilV* mutant are highly sensitive to shear stress. Our study shows that bacteria manipulate host cell functions to reorganize the host cell surface to form filopodia-like structures that enhance the cohesion of the microcolonies and therefore blood vessel colonization under the harsh conditions of the bloodstream.

Citation: Mikaty G, Soyer M, Mairey E, Henry N, Dyer D, et al. (2009) Extracellular Bacterial Pathogen Induces Host Cell Surface Reorganization to Resist Shear Stress. *PLoS Pathog* 5(2): e1000314. doi:10.1371/journal.ppat.1000314

Editor: H. Steven Seifert, Northwestern University Feinberg School of Medicine, United States of America

Received: October 28, 2008; **Accepted:** January 26, 2009; **Published:** February 27, 2009

Copyright: © 2009 Mikaty et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Work was funded by the INSERM, ANR, and CNRS.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: guillaume.dumenil@inserm.fr

Introduction

Infectious diseases leading to colonization of the blood by the infectious agent are a major burden to society. Such infections lead to devastating clinical manifestations including septic shock, hemorrhagic syndromes or infection of the brain (meningitis). Pathogens triggering such diseases are diverse and include viruses, bacteria (Gram-positive and Gram-negative), parasites and fungi. The common characteristic of these pathogens is their presence in the bloodstream at a given point of the infection process. Such pathogens are exposed to mechanical forces exerted by the blood flow, which follows a complex pattern throughout different blood vessels. This specific environment is increasingly recognized as a determining factor during pathogenesis and implies an adaptation of the pathogens [1–3]. One such infectious agent, used as a model in this study, is the Gram-negative bacteria *Neisseria meningitidis* [4].

N. meningitidis infection leads to two distinct clinical manifestations, a rapidly evolving form of septicemia or meningitis. The only known reservoir is the human nasopharynx, where the bacterium multiplies without causing symptoms in 10–20% of the human population who serve as carriers [5]. At a low frequency, bacteria cross the epithelial barrier and access the bloodstream,

causing septicemia. In the bloodstream, *N. meningitidis* interact with endothelial cells, cross the blood brain barrier (BBB) and proliferate in the brain [4,6].

One property of this pathogen thought to be key both in nasopharynx colonization and in disease development is its ability to adhere to host cells. As is the case for numerous pathogens, adhesive properties of *N. meningitidis* are mediated by filamentous organelles designated type IV pili [7]. In addition to adhesion, type IV pili allow bacteria to spontaneously form large aggregates in suspension and on the cellular surface. In *N. meningitidis*, expression of functional type IV pili on the bacterial surface requires 22 *pil* genes. The main and structural component of a pilus is the pilin, a protein encoded by the *pilE* gene in *N. meningitidis*. After being cleaved by the prepilin peptidase PilD, pilin subunits assemble in a helical fiber in the periplasm and exit the outer membrane through a pore [8]. In pathogenic *Neisseria* species, there are seven pilin-like proteins, so-called due to their conserved N-terminal PilD cleavage sequences: PilH, PilI, PilJ, PilK, ComP, PilV and PilX (referred to as PilL in *N. gonorrhoeae*) [9]. PilH, I, J and K are essential for Tfp biogenesis since the corresponding mutants are non-piliated [9,10]. In contrast, *comP*, *pilV* and *pilX* mutants are pilated, so the corresponding proteins are thought to insert in the

Author Summary

Certain infectious agents reach the bloodstream and succeed in surviving and multiplying at this site. This stage of the infection is associated with a life-threatening condition. The Gram-negative bacterium meningococcus, responsible for septicemia and meningitis, stands out as a paradigm of such a pathogen. Despite the characteristic flow-generated hydrodynamic forces of the bloodstream, meningococci have the striking ability to bind to the endothelium and to multiply in bacterial aggregates called microcolonies. Meningococci form aggregates in absence of eukaryotic cells, but we show that such aggregates are sensitive to mechanical stress, indicating that the presence of host cells enhances microcolony cohesion. Consistently, analysis of meningococcal microcolonies growing on the host cellular surface reveals that these structures are dense with cellular material in the form of cellular protrusions. Blocking this bacteria-induced cellular response renders microcolonies sensitive to blood flow. We then identify a bacterial component located on the outside of the bacteria and in direct contact with host cells as a key factor in the induction of this cellular response. This bacteria-induced cellular response is therefore a striking example of how pathogens exploit cellular functions as a survival strategy, in this case in the particular context of the bloodstream.

pilus fiber and mediate specific type IV pili dependent functions [9,11–14].

We previously demonstrated the importance of mechanical forces generated by the bloodstream on the process of pathogenesis [4]. In the bloodstream, shear stress levels vary between 5 and 100 dynes/cm² with values reaching 40 dynes/cm² in capillary networks commonly colonized by *N. meningitidis* during infection [15]. Initial binding to host cells is strongly inhibited by shear stress and can only occur in capillaries where shear stress occasionally decreases to values below 0.5 dynes/cm² for short periods of time before increasing back to values around 40 dynes/cm². After initial binding, bacteria proliferate on the cell surface and form large microcolonies strikingly resistant to high external forces generated by the bloodstream. These microcolonies eventually fill the entire lumen of the capillaries and could strongly affect the barrier function of the endothelium. The ability of these large bacterial colonies to resist blood flow on the surface of endothelial cells in brain capillaries is therefore a probable determining factor in subsequent crossing of the BBB. The mechanical environment of microcolonies is also important during nasopharynx colonization. Bacterial microcolonies forming on the epithelium are exposed to high levels of shear stress due to mucus flow, sneezing and coughing.

Like several extracellular pathogens including Group A *Streptococci* [16] and *Bartonella spp.* [17], *N. meningitidis* triggers a local remodeling of the eukaryotic cell membrane. In the case of *N. meningitidis*, surface remodeling results in numerous cell membrane projections that can be found inside and around microcolonies adhering to the cell surface [6,18,19]. Induction of these cellular projections was proposed to be the initial step of an invasion process leading to crossing of cellular barriers by transcytosis [6]. However, the low efficiency of invasion (approx. one bacteria per thousand completes transcytosis) suggests that the potent bacteria-induced remodeling of the host cell surface has other functions.

In vitro analysis of infection in culture allowed description of this cellular response at the molecular level. A profound actin cytoskeleton reorganization was found to take place at the base

of bacterial microcolonies [20] leading to the formation of a honeycomb lattice structure called “cortical plaque”. Ezrin, an actin binding protein member of the ERM (Ezrin/radixin/moesin) family, is abundantly recruited to the tip of cellular projections surrounding *N. meningitidis* [18]. Furthermore, in addition to ERM family proteins, numerous host cell transmembrane proteins such as ICAM-1, CD44, CD46 and ErbB2 are clustered under microcolonies [18,20–22].

In the closely related pathogen *N. gonorrhoeae*, mutants defective in the biosynthesis of type IV pili were shown to be unable to induce host cell membrane remodeling [20]. The ability of type IV pili to retract is important for optimal signaling, but if there is a specific component of type IV pili beyond retraction force *per se* involved in triggering the cellular response, it remains to be identified [23].

The goal of this study was to identify the molecular mechanism allowing large bacterial aggregates to resist the high mechanical forces exerted by the blood flow in brain capillaries during pathogenesis and by mechanical forces operating in the nasopharynx during colonization. Hence, the study was conducted mostly on endothelial or in some cases epithelial cells. We first show that bacterial auto-aggregation is insufficient to explain the mechanical resistance of microcolonies growing on the host cell surface. Pharmacological compounds targeting specific cellular functions were then used to identify processes involved in increasing microcolony cohesion. Finally we identified bacterial factors involved in triggering the cellular response underlying the increased mechanical resistance of microcolonies.

Results

Type IV pili-dependent bacterial autoaggregative properties are insufficient to explain the mechanical resistance of microcolonies growing on the cellular surface

We previously showed that *N. meningitidis* growing in tight bacterial aggregates on eukaryotic cellular surfaces are highly resistant to external forces exerted by the harsh conditions found in the nasopharynx or in the bloodstream [4]. As this property of meningococci is likely to be a determining factor of nasopharynx colonization and pathogenesis we undertook to further explore its molecular basis. When proliferating in suspension, *N. meningitidis* form bacterial aggregates of different sizes, spontaneously and independently of the adhesion to host cells; this process depends on type IV pili. Our first hypothesis was therefore that bacteria-bacteria interactions could explain the mechanical resistance of bacterial colonies growing on the cellular surface. To test this we compared cohesive forces involved in bacterial aggregates growing on the cellular surface *vs.* forces for aggregates growing in suspension by studying their rupture under controlled shear stress.

Bacteria were exposed to shear stress in a laminar flow chamber (Figure 1A) as previously described [4]. GFP-expressing bacteria were allowed to grow on cells until they formed microcolonies, at which point mechanical force was introduced with liquid flow. As expected, shear stress could be increased to 10 dynes/cm² for a period of 5 min without any sign of detachment (Figure 1B, compare left and right panels). To quantify the effect of flow, bacteria growing on cells were collected and plated to determine the number of colony forming units (CFU, Figure 1C). The number of CFUs did not change after the introduction of flow. Bacterial colonies were in fact resistant to shear stress levels of 100 dynes/cm², a value which represents the highest forces operating in large blood vessels (Figure 1D). Under the assumption that bacteria behave as spherical beads, it can be estimated that a shear stress of 100 dynes/cm² exerts a force of about 300 pN on a single

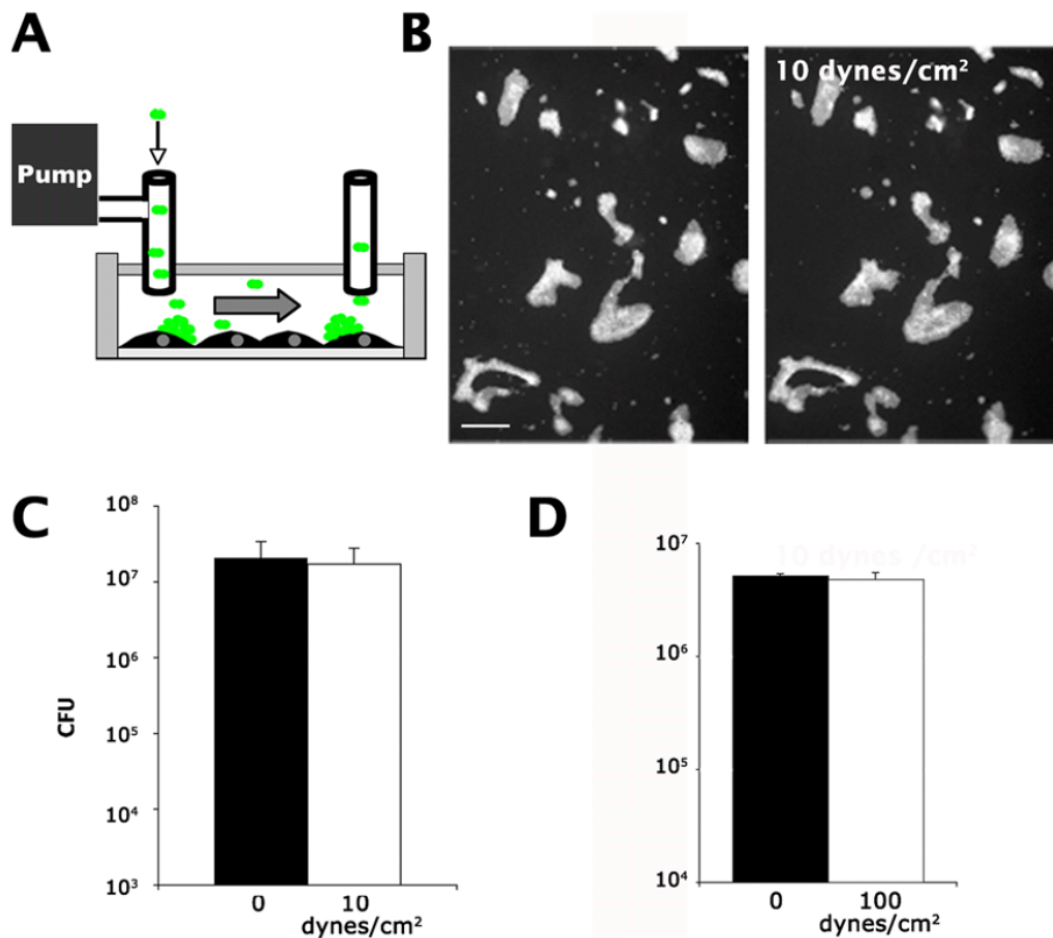


Figure 1. Bacterial aggregates adhering to host cells are highly resistant to shear stress. Bacterial aggregates on the cellular surface were submitted to shear stress and the ability of the aggregates to remain intact was compared (scale bars corresponds to 50 μm). (A) A monolayer of endothelial cells was infected with *N. meningitidis* expressing GFP for a period of 3 hours to allow microcolony formation as observed by fluorescence microscopy. Infected cells were then submitted to 10 dynes/cm² in a laminar flow chamber as depicted on the diagram for a period of 5 min. (B) Aggregates remained unchanged before and after application of 10 dynes/cm² (compare left and right panels). (C) The number of colony forming units before (black bars) and after (white bars) application of 10 dynes/cm² was determined by a dilution plating and CFU determination. (D) The effect of 100 dynes/cm² was determined.
doi:10.1371/journal.ppat.1000314.g001

bacterium, or 30 nN on a 10 μm wide colony [24]. When growing on cells, bacterial aggregates are therefore highly resistant to mechanical stress.

The resistance of bacterial aggregates growing in suspension and in the absence of cells was then tested using a cone and plate device to ensure a homogeneous shear stress throughout the entire sample (Figure 2A). Bacteria were grown in suspension under conditions allowing the formation of aggregates of various sizes, similar to those found on the surface of human cells (7–15 μm in diameter). Under the same conditions, a mutant lacking type IV pili did not form any aggregates (not shown). Introduction of 10 dynes/cm² dramatically decreased the number of aggregates (Figure 2B, compare left and right panels). To quantify the effect, the size distribution of the aggregates was then determined microscopically by automatic image analysis. In absence of shear stress, aggregates ranged over a wide size distribution with the smallest aggregates involving only a few bacteria and others occasionally reaching sizes up to 10,000 bacteria. For further analysis we limited our analysis to a window of sizes between 500 and 5000 bacteria to match aggregate sizes found on the cell

surface. Such suspensions of bacterial aggregates were submitted to different levels of shear stress varying between 2.5 and 10 dynes/cm² and the number of aggregates was determined (Figure 2C). Shear stress levels as low as 2.5 dynes/cm² were sufficient to significantly affect the number of aggregates in the suspension and the effect increased with the intensity of shear. Application of 10 dynes/cm² led to a nearly twenty-fold decrease in the number of aggregates. As a comparison, the effect of shear stress on aggregates formed by the *pilT* mutant was determined. The *pilT* mutant is characterized by a defect in pilus retraction, bacteria are hyperpiliated and the *pilT* strain forms aggregates that are unusually large and numerous. Application of 10 dynes/cm² shear stress had no effect on the number of aggregates (Figure 2D). Sensitivity of aggregates in suspension to shear stress is therefore a pilus retraction-dependent property.

To confirm these results under conditions more closely mimicking those found when bacteria are growing on the cellular surface in the flow chamber, bacteria were immobilized on a glass surface with an adsorbed antibody directed against the major pilin and allowed to proliferate before their mechanical resistance was

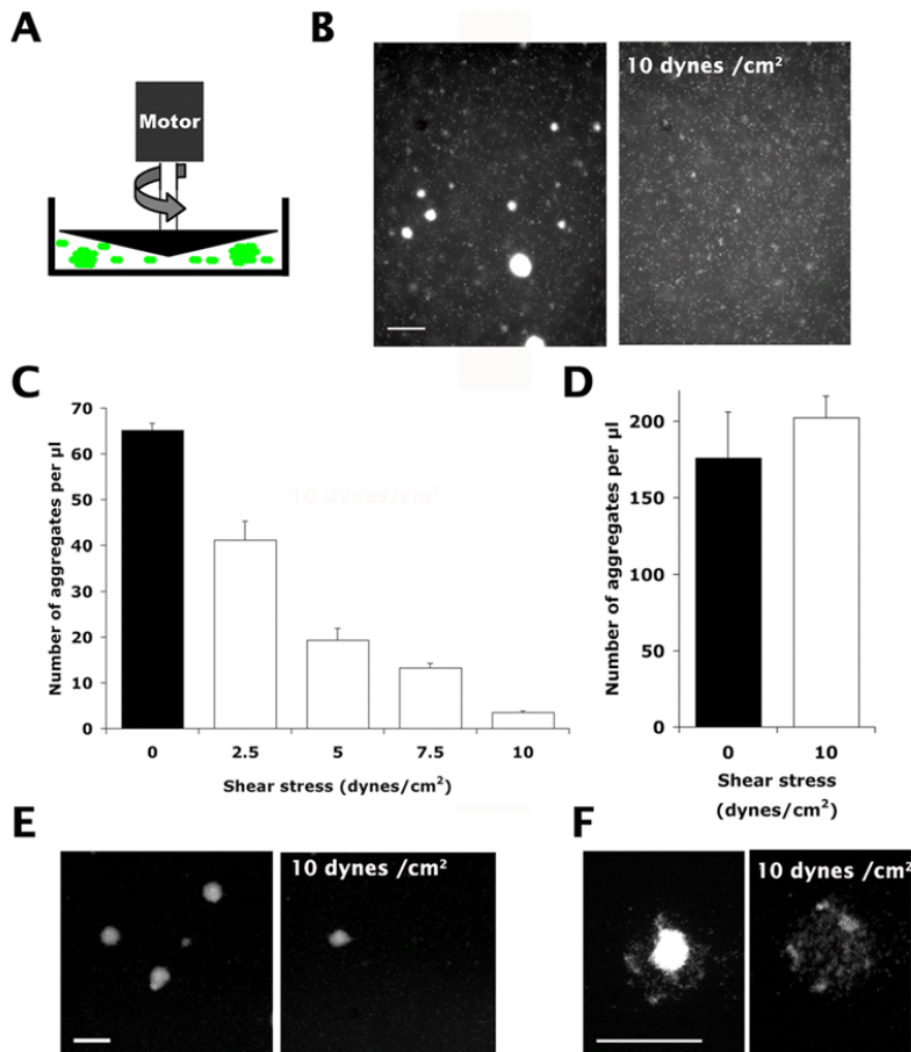


Figure 2. Bacterial aggregates in suspension are sensitive to shear stress. Bacterial aggregates in the absence of host cells were submitted to shear stress and the ability of the aggregates to remain intact was compared (scale bars corresponds to 50 μm). (A) GFP-expressing *N. meningitidis* proliferating in suspension in cell culture medium were analyzed under a microscope to visualize aggregates of whose number and size were determined by microscopy and automated image analysis. Bacterial aggregates were submitted to 2.5–10 dynes/cm² shear stress levels in a cone and plate device as depicted on the diagram and aggregates analyzed. (B) Aggregates in suspension were disrupted after application of 10 dynes/cm² (compare left and right panels). (C) The effect of different shear stress levels on the number of bacterial aggregates was determined. (D) The effect of shear stress was determined for the *pilT* strain deficient for pilus retraction. (E) Bacteria were immobilized on a glass slide coated with a monoclonal antibody directed against type IV pili, allowed to proliferate and colonies were submitted to 10 dynes/cm². (F) Higher magnification view of a colony immobilized on a glass slide before and after shear stress application. doi:10.1371/journal.ppat.1000314.g002

evaluated. Bacteria growing on the glass surface formed large aggregates similar in shape and size to those found on cells. Introduction of 10 dynes/cm² led to the progressive detachment of the colonies (Figure 2E, compare left and right panels). Higher magnification observation shows that a monolayer of bacteria remains attached to the glass slide after application of shear stress (Figure 2F). Taken together, these results show that wild type *N. meningitidis* bacterial aggregates are sensitive to shear stress levels in the range of 2.5–10 dynes/cm² when not attached to host cells. This indicates that the forces engaged in the cohesion of the suspended aggregates were at least one order of magnitude lower than those ensuring mechanical resistance of microcolonies formed by *N. meningitidis* at the surface of host cells.

Lipid microdomain disruption by cholesterol depletion of the host cell plasma membrane renders microcolonies sensitive to mechanical stress

The sensitivity to shear stress of bacterial aggregates in suspension suggests that host cells play an active role in conferring mechanical resistance to bacterial microcolonies on the cell surface. To identify the cellular components involved in conferring mechanical resistance to microcolonies, inhibitors of several cellular processes were tested. Results presented here focus on drugs targeting the actin cytoskeleton (cytochalasin D), the microtubule network (nocodazole) and plasma membrane lipid composition (methyl- β -cyclodextrin (MBCD)).

Cytochalasin D (1 μ M) and nocodazole (1 μ M) treatment did not affect the cohesion of microcolonies, indicating that neither the actin nor microtubule cytoskeleton was involved in conferring mechanical resistance (Figure 3A, Cytochalasin D and Nocodazole). The efficiency of these drugs was monitored by immunofluorescence visualization of their effects on F-actin and microtubules. In contrast, treatment with M β CD at a concentration of 4 mM led to a twenty-fold decrease in the number of adherent bacteria (4.7×10^7 vs. 2.5×10^6). By decreasing the cholesterol concentration in the plasma membrane, M β CD inhibits the formation of lipid rafts, a process necessary for numerous cellular signaling pathways [25]. Among our panel of inhibitors, M β CD was the only drug that had an effect on the mechanical resistance of microcolonies. The effect was reversed by repletion of cholesterol (Figure 3A, M β CD+Chol). Video microscopy revealed that after M β CD addition and flow increase, microcolonies were less tightly associated with the cellular surface and found to be progressively disrupted, leaving a monolayer of bacteria directly in contact with the cellular surface (Figures 3B, Video S1 and S2). Importantly, M β CD did not affect the ability of the bacteria to form aggregates in suspension nor did it affect the amount of pili present on bacteria growing in suspension or on cells as seen by

immunofluorescence (data not shown). The two- vs. three-dimensionality of microcolonies was easily discernible by phase contrast microscopy but can be best documented with confocal microscopy (Figure 3C). The frequency of two- and three-dimensional microcolonies was determined following M β CD treatment and the application of shear stress (Figure 3D, white and black bars respectively). In the absence of shear stress, 66 \pm 0.3% of microcolonies were multilayered. As expected, in the absence of the drug, microcolonies were resistant to shear stress. Upon treatment of cells with 6 mM M β CD, the frequency of three-dimensional colonies dropped from 63 \pm 0.4% to 36 \pm 0.8% following application of flow. The effect was concentration dependent, with intermediate values at a concentration of 4 mM M β CD.

Strikingly, disruption of the actin and microtubule cytoskeletons did not affect microcolony cohesion. In contrast, altering plasma membrane composition by depleting plasma membrane cholesterol pools rendered bacterial colonies sensitive to mechanical stress. These results show that host cells actively participate in maintaining bacterial adhesion in the presence of mechanical stress by a plasma membrane dependent process likely involving lipid rafts.

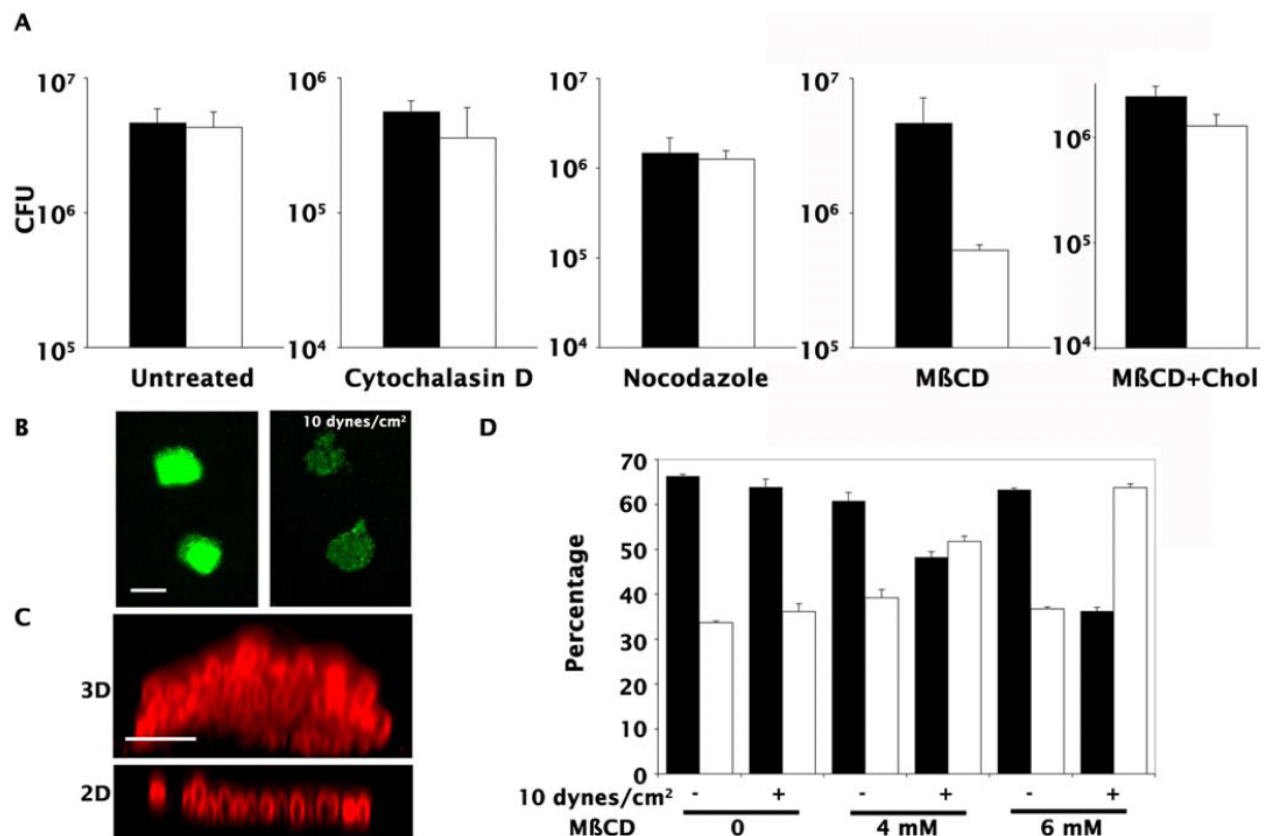


Figure 3. Host cell cholesterol depletion with cyclodextrin renders bacterial microcolonies sensitive to shear stress. Implication of specific cellular functions was tested using inhibitors targeting actin cytoskeleton, microtubules or plasma membrane cholesterol. (A) The effect of increasing shear stress on GFP-expressing wild type microcolonies growing on cells treated with cytochalasin D, Nocodazole, or methyl β cyclodextrin (M β CD) was analyzed by a plating assay, before (black bars) and after flow increase (10 dynes/cm², white bars). The effect of cholesterol repletion is also indicated (M β CD+Chol). (B) Application of shear stress on infected cells treated with M β CD led to the appearance of numerous flat two-dimensional microcolonies (right panel) visible under the fluorescence microscope in contrast with the large three-dimensional microcolonies (left panel) observed on untreated cells (scale bars correspond to 10 μ m). (C) Images of 2D and 3D microcolonies were taken with a confocal microscope and the Z-section is presented (scale bars correspond to 3 μ m). (D) The frequency of 2D (white bars) and 3D (black bars) microcolonies was determined under the different conditions and expressed as the percentage of the total number of colonies.

doi:10.1371/journal.ppat.1000314.g003

Lipid microdomain disruption blocks formation of bacteria-induced cellular projections

N. meningitidis proliferating on the cellular surface form tight aggregates and trigger a local cellular response with the formation of cellular projections between and around diplococci [18] that could explain the difference of behavior between aggregates in suspension and on the cellular surface. To challenge such a hypothesis, we tested whether cholesterol depletion affected this bacteria-induced cellular response.

The effect of cholesterol depletion, actin cytoskeleton disorganization and microtubule disruption on the ability of bacterial microcolonies to recruit cellular components in the cortical plaque was first determined by immunofluorescence. Cellular treatment with cytochalasin D or nocodazole did not have any effect on the amount of ezrin recruited by *N. meningitidis*, whereas M β CD dramatically decreased the amount of ezrin recruitment (Figure 4A, compare top and bottom panels). Similarly, cytochalasin D or nocodazole did not significantly affect the frequency of microcolonies recruiting ezrin, whereas with M β CD treatment the frequency decreased from 83 \pm 3% to 27 \pm 11% (Figure 4B). A dose response curve indicated that the effect of M β CD increased with concentration both on epithelial and endothelial cells (figure 4C, full and open circles respectively). In addition, the effect of M β CD was fully reversed by the addition of cholesterol (Figure 4C, full and open square respectively). Similar results were obtained with other components of the cortical plaque, CD44,

ErbB2 or ICAM-1 (not shown). Cholesterol depletion therefore prevents the recruitment of cellular components of the cortical plaque under the bacterial microcolonies.

The potent effect of cholesterol depletion suggested that cholesterol-rich lipid microdomains could be involved in bacteria-induced cellular response. Host plasma membrane cholesterol was detected with Filipin to test this idea. Large amounts of cholesterol were found clustered under 93% of bacterial microcolonies, consistent with a role of lipid microdomains (Figure 4D).

To document the effect of lipid microdomain disruption on the formation of the filopodia-like protrusions, infected epithelial and endothelial cells were processed for scanning or transmission electron microscopy. Bacteria formed tight aggregates on the epithelial surface and were surrounded by a dense network of fibrous cellular material forming a nest around the bacteria (Figure 5A). Transmission electron microscopy gives a view of the inside of the colony (Figure 5A, lower panel) with projections in tight association with all the bacteria forming the microcolony. Similar images were obtained with bacteria growing on the surface of endothelial cells (Figure 5B) although the network of cellular projections was not as dense as on epithelial cells. Cellular projections could easily be distinguished from type IV pili at higher magnifications although surprisingly few pili fibers could be visualized by scanning electron microscopy in contrast with immunofluorescence studies which visualize a dense meshwork of pili (data not shown and see Figure 6A). Pili visualized on bacterial aggregates by scanning electron microscopy in the absence of cells are

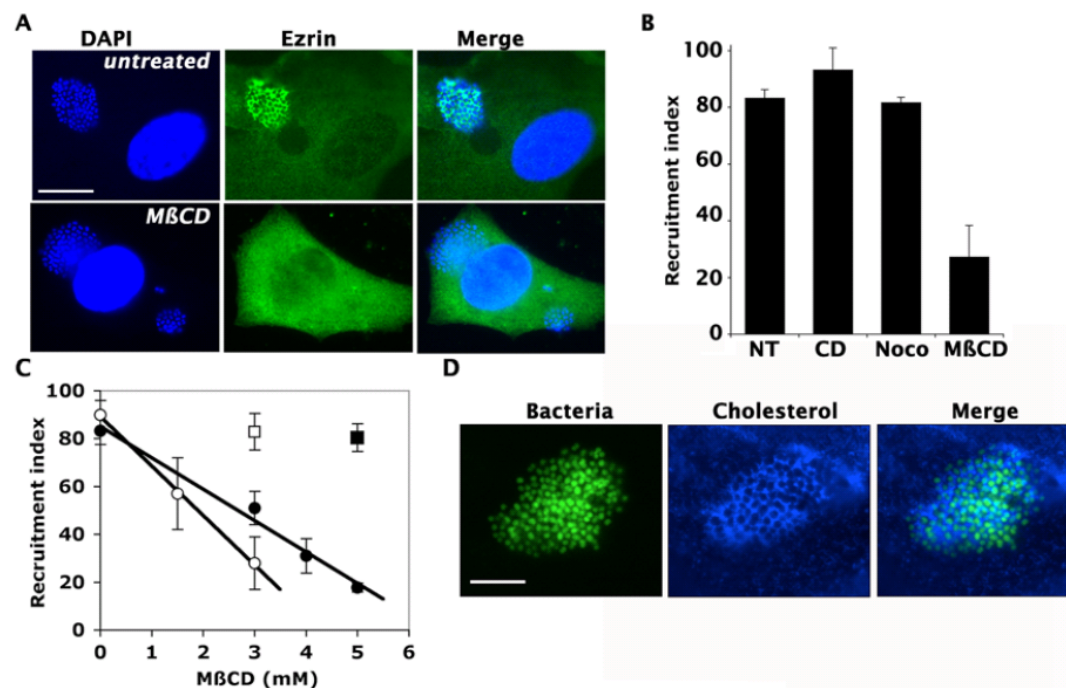


Figure 4. Lipid microdomain disruption by cholesterol depletion prevents bacteria-induced cellular response. The effect of cholesterol depletion by methyl- β -cyclodextrin (M β CD) on the interaction of *N. meningitidis* with host cells was tested. (A) Ability of *N. meningitidis* microcolonies to recruit cellular components determined by immunofluorescence using Ezrin as a marker. Bacteria and nuclei were stained with DAPI (DAPI); Ezrin was detected with anti-Ezrin polyclonal anti-serum (Ezrin); and images were merged (Merge). Scale bar corresponds to 10 μ m. The top set of images are untreated cells and in the bottom set, cells were treated with M β CD. (B) Frequency of bacterial microcolonies efficiently recruiting ezrin (recruitment index) for non-treated cells (NT), in the presence of Cytochalasin D (CD), Nocodazole (Noco), and M β CD. (C) Dose response effect of M β CD with regard to the ability of bacterial microcolonies to reorganize the cellular surface on the surface of epithelial cells (full circles) and on endothelial cells (open circles). To control that the effect of M β CD was due to cholesterol, repletion experiments with added cholesterol were performed with both cell types (squares, open for endothelial cells and full for epithelial cells). (D) Cholesterol localization under bacterial microcolonies. GFP-expressing bacteria were used (Bacteria); Cholesterol was detected with Filipin (Cholesterol); and images were merged (Merge). The scale bar corresponds to 5 μ m.
doi:10.1371/journal.ppat.1000314.g004

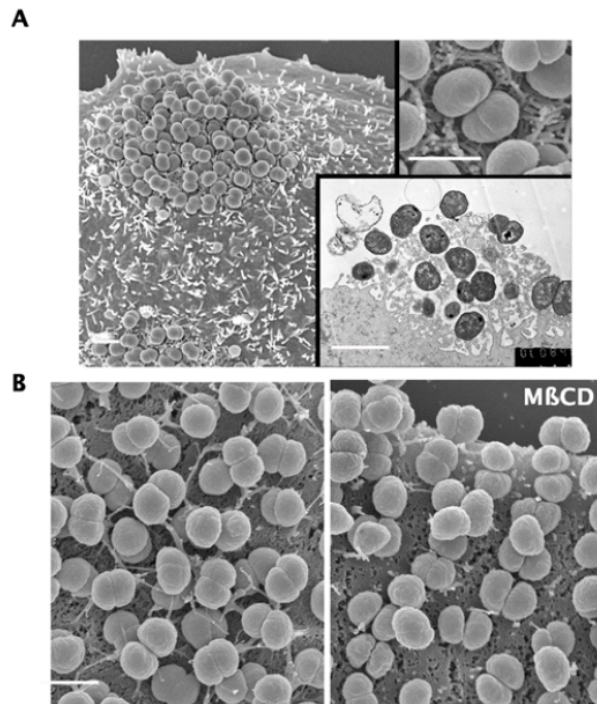


Figure 5. Lipid microdomain disruption prevents the formation of bacteria-induced cellular projections. (A) Human epithelial cells infected with *N. meningitidis* were visualized by electron microscopy to document the organization of bacterial microcolonies in relation with the cellular surface. Low magnification scanning electron microscopy shows bacteria growing in tight aggregates on the cellular surface (scale bars are 1 μ m). Higher magnification shows the presence of numerous projections under and around individual bacteria in the aggregates. Transmission electron microscopy analysis of bacterial microcolonies showing the dense network of projections surrounding the bacteria is presented in the lower inset. (B) Scanning electron microscopy analysis of infected endothelial cells shows cellular projections (scale bar is 1 μ m). Cells were treated with M β CD during infection and processed for scanning electron microscopy. The number and length of cellular projections is strongly reduced after M β CD (compare left and right panels). doi:10.1371/journal.ppat.1000314.g005

not completely smooth, vary in diameter and are rarely observed in bundles larger than 25 nm. In contrast, cellular protrusions on non-infected epithelial cells are smooth, round and homogeneous in diameter, 100 nm. In addition, PFA-fixation of cells prior to infection completely prevents the formation of these structures, indicating that they are of cellular origin. Endothelial cells treated with 5 mM M β CD displayed a dramatic reduction in bacteria-induced cellular projections (Figure 5B, compare left and right panels). Cholesterol depletion allowed the formation of the cellular projections (data not shown). *N. meningitidis*-induced reorganization of the host cell plasma membrane is therefore dependent on the presence of membrane cholesterol for the integrity of lipid rafts, and a strong correlation exists between the presence of bacteria-induced cellular projections and the cohesion of microcolonies.

Bacteria-induced cellular projection formation depends on minor pilin PilV

We next sought to identify bacterial factors involved in triggering the reorganization of the host cell plasma membrane.

Previous studies have highlighted the role of type IV pili in triggering *Neisseria gonorrhoeae*-induced host cell surface reorganization [20]. Deletion of the *pilE* gene encoding the main type IV pilus component leads to a drastic decrease in the clustering of cytoskeletal proteins under *Neisseria gonorrhoeae* microcolonies. Although this is likely the case in *N. meningitidis*, the situation is complicated by the loss of adhesion of the *N. meningitidis pilE* mutant. Consistent with a direct role of pili, detailed examination of high resolution scanning electron micrographs of infected epithelial cells revealed that in several instances pili were associated with the tip of bacteria-induced filopodia-like structures (Figure 6A). Pilus retraction is important to trigger cortical plaque formation as a *pilT* mutant, unable to retract its pili, is less efficient in triggering this response [20]. In addition to *pilT*, three proteins known as minor pilins, PilX, ComP and PilV are prime candidates as pili components responsible to trigger a cellular response. They are thought to insert in the pilus fiber and could interact directly with the host cell surface to trigger a cellular response [12–14]. Because of the strong defect in adhesion of the *pilX* mutant, the potential role of the PilX protein in triggering the cellular response could not be tested. Microcolonies formed by the *comP* mutant recruited ezrin as efficiently as the wild type strain. In contrast with observations in *N. gonorrhoeae* [14], adhesion efficiency of the *pilV* mutant in *N. meningitidis* was quantitatively indistinguishable from the wild type strain (Figure 7D, black bars). Consistently, the amount of pili present on the surface of the *pilV* mutant was indistinguishable from the wild type strain. This was determined by ELISA on whole bacteria and by immunofluorescence (data not shown). We therefore tested the ability of the *pilV* mutant to recruit ezrin. Under DAPI-stained bacteria in wild type microcolonies growing on endothelial cells, ezrin was abundantly recruited in the typical honeycomb lattice structure. However, the *pilV* mutant was strongly affected in its ability to recruit ezrin (Figure 6B). The same decrease was found for other proteins normally recruited under *N. meningitidis* microcolonies including actin, cortactin, ErbB2, CD44, or ICAM-1 (data not shown). This *pilV* mutant effect was also observed on other eukaryotic cell types (data not shown). To quantitate this effect, the frequency of colonies efficiently recruiting ezrin was determined; while 91+/-2% and 90+/-5% of wild type and *comP* microcolonies efficiently recruited ezrin, only 27+/-2% *pilV* colonies did (Figure 6C, recruitment index). The *pilV* mutation was complemented with an intact copy of the gene. In this construct, the *pilV* gene is regulated at the transcriptional level by an IPTG inducible promoter (*pilV_{ind}*). In the presence of 100 μ M IPTG, colonies efficiently recruited ezrin with a recruitment index of 86+/-5% (Figure 6C, *pilV_{ind}*). The presence of IPTG led to increased levels of protein as shown by western blot (Figure 6D). Microcolonies formed by the *pilT* strain are morphologically different from those formed by the wild type strain and comparison is difficult. Nevertheless, in the same conditions we found that 63+/-20% of microcolonies formed by the *pilT* strain recruited ezrin (Figure 6C).

To extend these findings, we next evaluated by scanning electron microscopy whether a *pilV* mutant could trigger the formation of cellular projections. Endothelial and epithelial cells were challenged with *N. meningitidis* for 2 hours and cells were processed for scanning electron microscopy. Numerous cellular projections were associated with wild type bacteria growing on endothelial cells (Figure 6E, WT) but this effect was strongly reduced with the *pilV* mutant where bacteria were associated with a flat cellular surface (Figure 6E, *pilV*). Absence of PilV therefore strongly reduces the ability of the bacteria to reorganize the cellular surface and to recruit underlying cellular components.

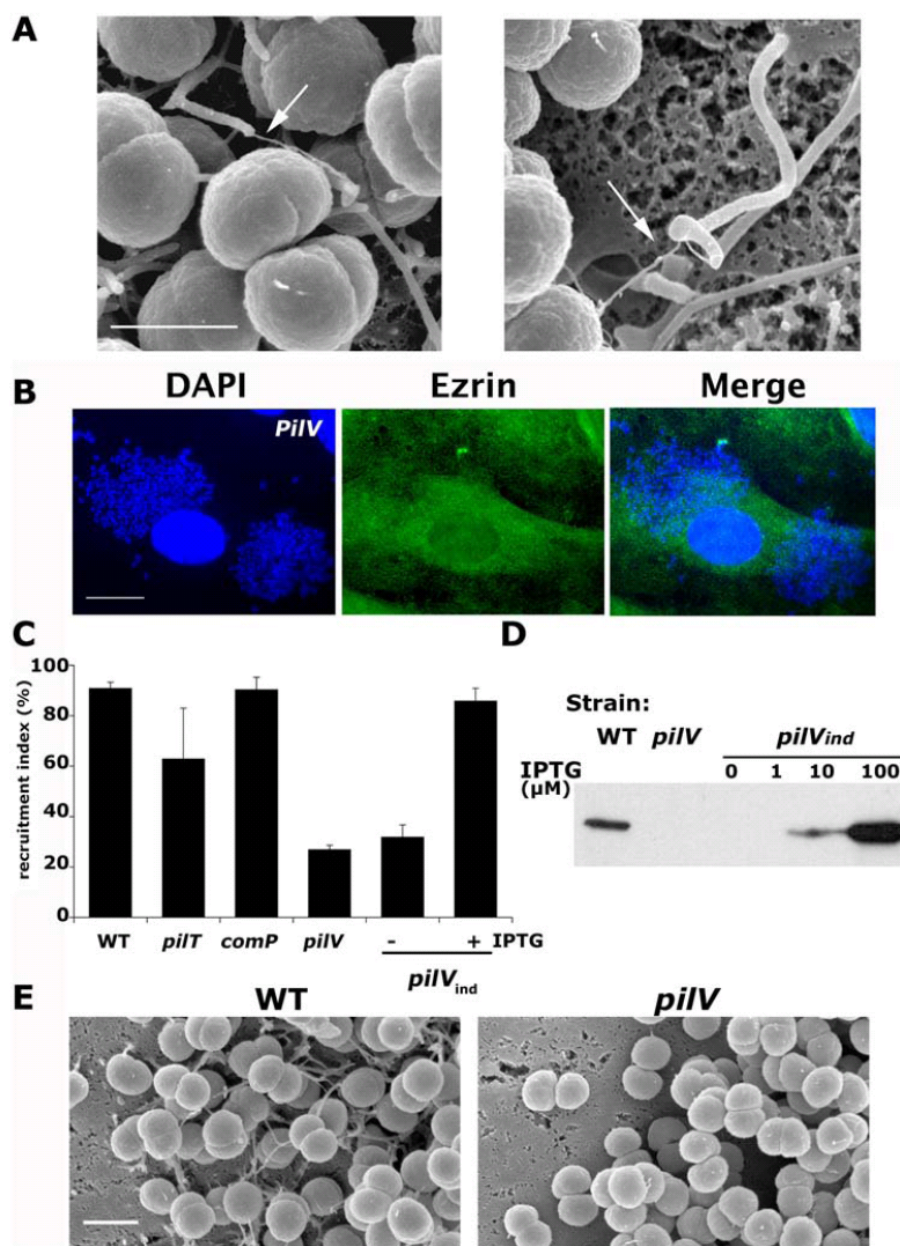


Figure 6. The minor pilin PilV is necessary to induce cellular surface reorganization. Characterization of the ability of a mutant in the *pilV* gene to reorganize host cell plasma membrane of endothelial cells. (A) High resolution scanning electron micrographs showing direct contacts between pili and bacteria-induced cellular protrusions on epithelial cells (arrows, scale bar corresponds to 1 μm). (B) Immunofluorescence analysis of the cellular response to infection with the *pilV* mutant (*pilV*). Bacterial aggregates on the endothelial surface were visualized with DAPI staining (DAPI). Ezrin immunostaining was used as a marker for the recruitment of cytoskeletal components (Ezrin). Scale bar corresponds to 10 μm. (C) Quantification of the effect of the *pilV* mutation on the ability of *N. meningitidis* to recruit ezrin under microcolonies. The frequency of ezrin recruitment under individual microcolonies (recruitment index) is represented for the wild type strain (WT), the *comP*, *pilT*, and *pilV* mutants and the complemented *pilV* strain (*pilV_{ind}*) in the presence or absence of inducer (100 μM IPTG). (D) Total protein levels of PilV in the different indicated strains and with different doses of IPTG. (E) Scanning electron microscopy analysis of the cellular surface reorganization induced by wild type (WT) on endothelial cells and absent in the *pilV* mutant (*pilV*), (scale bars correspond to 1 μm).
doi:10.1371/journal.ppat.1000314.g006

PilV dependent cellular projection formation is required to generate shear stress resistant microcolonies

Given that the *pilV* mutant adheres to host cells and forms microcolonies normally but does not induce a cellular response, and that bacterial aggregates in solution in the absence of host cells

have low mechanical resistance, we hypothesized the mechanical resistance of the *pilV* mutant microcolonies might also be low. The flow chamber assay was used to test the ability of *pilV* microcolonies to resist to external forces while growing on the epithelial surface. As expected, in the control experiment with wild

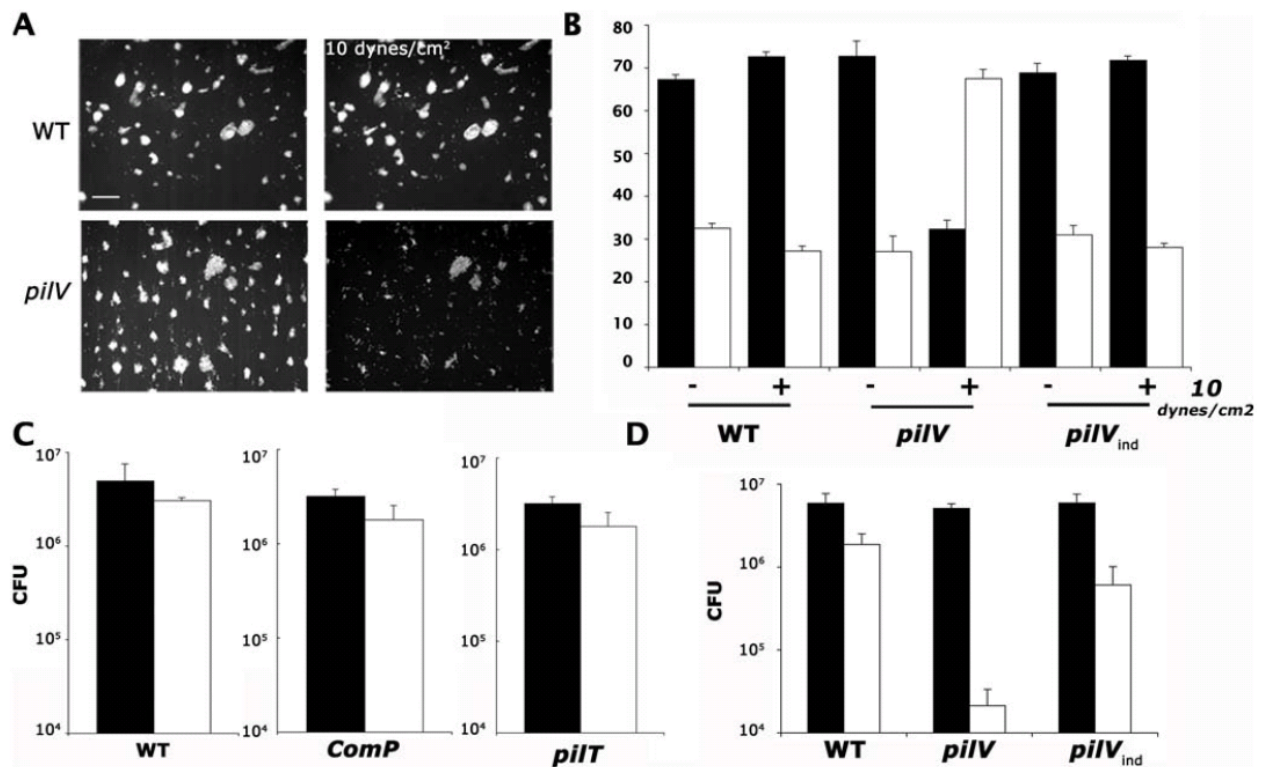


Figure 7. PilV is required to maintain integrity of bacterial microcolonies in the presence of shear stress. The ability of microcolonies formed by a *pilV* mutant to resist shear stress was tested. (A) Microcolonies on a cellular monolayer formed by wild type or the *pilV* mutant expressing GFP were submitted to liquid flow generated force (10 dynes/cm²) in a laminar flow chamber. Images of fluorescent bacteria before and after flow increase are presented (scale bars correspond to 50 μ m). (B) The morphology of microcolonies was determined before and after shear stress application and the frequency of 2D (white bars) and 3D (black bars) microcolonies determined. (C–D) The number of bacteria adhering to cells before (black bars) and after application of 10 dynes/cm² shear stress (white bars) was determined by the plating assay for the indicated strains. doi:10.1371/journal.ppat.1000314.g007

type bacteria, microcolonies resisted high liquid flow without detectable detachment (Figure 7A, WT). In contrast, microcolonies formed by the *pilV* mutant were disrupted in the presence of 10 dynes/cm² shear stress (Figure 7A, *pilV*). Dynamic observation by video microscopy revealed a gradual disruption of *pilV* mutant microcolonies by mechanical stress (Video S3), in contrast to colonies formed by wild type bacteria where increased shear stress had no visible effect (Video S1). To obtain a quantitative measure of the effect, the morphology of colonies was determined in the presence of flow for the wild type, *pilV* and *pilV_{ind}* strains. As previously shown, the frequency of multilayered wild type microcolonies did not change in the presence of flow (Figure 7B, WT). With the *pilV* strain however, the frequency of multilayered microcolonies decreased from 72% \pm 3% to 32% \pm 2% (Figure 7B, *pilV*). Complementation of the *pilV* mutation with a wild type copy restored the ability of the microcolonies to resist mechanical stress (Figure 7B, *pilV_{ind}*). PilV is therefore necessary under flow conditions to maintain microcolony cohesion at the cellular surface.

Quantitative measurement of the effect of shear stress was then performed using the plating assay described previously. As expected, increased shear stress had little effect on the wild type or *comP* microcolonies (Figure 7C, WT, *comP*). Colonies formed by the *pilT* mutant were also highly resistant to shear stress. In absence of *pilV* (Figure 7D), bacteria adhered and formed colonies with the same efficiency as the wild type but introduction of shear stress decreased the number of bound bacteria by over one hundred-fold (5.1 \pm 0.6 \times 10⁶ to 2.1 \pm 1.2 \times 10⁴). Reintroduc-

tion of a wild type copy of the *pilV* gene rescued the phenotype (*pilV_{ind}*). The protein PilV is therefore necessary to maintain the integrity of bacterial microcolonies in the presence of mechanical stress. In absence of mechanical stress, however, adhesion and proliferation in aggregates occurs normally.

Discussion

N. meningitidis can be considered a commensal of the human nasopharynx as these bacteria can survive and multiply in this environment without causing damage, except in the rare but devastating cases when they access the bloodstream. In both cases *N. meningitidis* adopt a specific lifestyle by adhering to the cellular surface where they proliferate in tight, three-dimensional aggregates known as microcolonies in close association with the plasma membrane. We show here that mechanical resistance of microcolonies is dependent on the reorganization of the host cell surface induced by the bacteria. We identify the minor pilin PilV as a central player in inducing this response. Wild type bacteria trigger the formation of cellular projections, which confer ability to resist liquid flow generated mechanical stress (Figure 8, WT). When bacteria are unable to trigger this cellular response, microcolonies become sensitive to shear stress and most bacteria detach except those directly in contact with host cells (Figure 8, *pilV* or MBCD).

Exactly how cellular projections confer mechanical resistance to the microcolony is not completely clear but our results suggest that the formation of cellular projections exert their effect by favoring

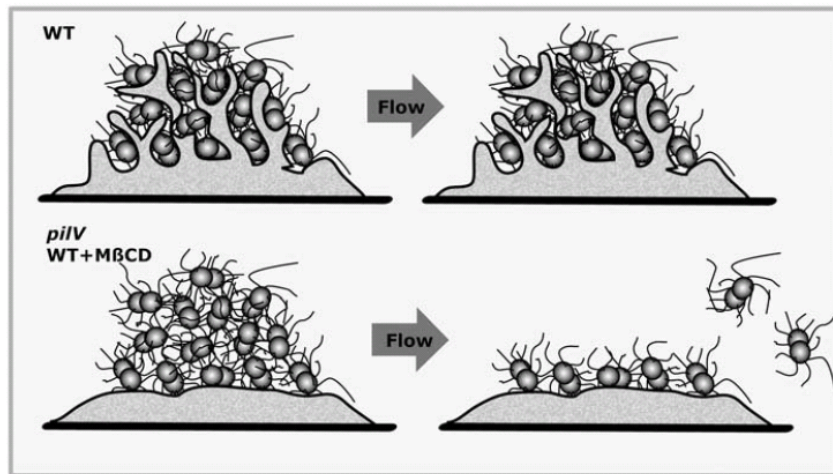


Figure 8. Schematic representation of the link between the ability of microcolonies to resist mechanical force and bacteria induced cellular response. Wild type bacteria trigger a massive reorganization of the plasma membrane and thus resist flow. The *pilV* mutant, in contrast, is able to adhere and form three-dimensional microcolonies but is not able to reorganize the cellular surface and renders the microcolony sensitive to shear stress. A similar effect occurs when cholesterol is depleted from the host cell with MBCD.
doi:10.1371/journal.ppat.1000314.g008

direct interaction between the bacteria in the aggregate and the host cell plasma membrane. In a bacterial aggregate adhering to the host cell two types of interactions take place: bacteria/bacteria and bacteria/host. Prior to this study the consensus was that three-dimensional microcolony formation was only dependent on the ability of the bacteria to form bacteria/bacteria interactions, a process being dependent on type IV pili. We show here that under conditions mimicking the mechanical stress found in the nasopharynx and the bloodstream, bacterial aggregation is not sufficient to maintain cohesion of the microcolonies. We have previously shown that individual bacteria adhering to the host cell surface are resistant to high shear stress levels [4], indicating the bacteria/cell interaction is shear stress resistant. In the case of wild type bacteria, and in contrast to the *pilV* mutant, every bacterium in the aggregate has the opportunity to directly come into contact with the host cells through the bacteria-induced projections. Reorganization of the host cell plasma membrane induced by the bacteria would therefore stabilize the adhesion of additional bacteria. To describe this collective behavior we propose the term “cooperative adhesion”, to convey the sense that initial adhesion triggers the host cell structural rearrangement that allows subsequent bacteria to adhere in a mechanically resistant microcolony.

An important implication is that the process known as bacterial adhesion is in fact a multistep process. A first consequence of the present findings is that before adhesion, bacteria proliferating in suspension in the bloodstream cannot form aggregates simply because of level of shear stress. In the bloodstream, shear stress levels range between 10 and 100 dynes/cm², and already at 10 dynes/cm² bacterial aggregates disassemble. In the blood, initial attachment therefore likely takes place with individual bacteria or possibly small aggregates. Adhesion starts with the establishment of contact with the host cells by pioneer diplococci followed by proliferation with the formation of aggregates through bacteria-bacteria contacts and concomitantly the induction of cellular projections that maintain direct contact between bacteria and host

cells and thus strengthen cohesion. Interestingly certain of these steps can be genetically distinguished, as the *pilV* mutant is only deficient for the step involving the strengthening of microcolony cohesion whereas mutants such as *pilC1* are deficient for the initial attachment step [4].

Previous work showed the importance of *Neisseria spp.* type IV pili in triggering a cellular response. Pilus retraction has been implicated in triggering host cell response as a *pilT* mutant exhibits decreased signaling [20]. From the biophysical point of view it is important to note that the forces created by pilus retraction are in the same range than the forces generated by shear stress if one considers that several pili bundles are involved in contacts with each host cell. According to Goldman *et al.*, under flow-generated shear stress, a rough estimate of the force exerted on a 10 µm wide colony at 100 dynes/cm² would be 30 nN [24], whereas a single pilus bundle can exert forces in the 1 nN range [26]. These observations prompted us to evaluate the mechanical resistance of aggregates formed by the retraction deficient *pilT* strain. We show here that in contrast to the wild type strain, application of shear stress to *pilT* mutant aggregates does not lead to their disruption. This result highlights the unusual properties of *pilT* aggregates and explains why despite a decreased cellular response, *pilT* aggregates growing on a cellular surface are resistant to shear stress. Absence of detachment in the presence of shear stress could also be due to the fact that the effect of the *pilT* mutation on bacteria-induced cellular response is less pronounced than the *pilV* mutation. However, pretreatment of cells with MBCD and infection with the *pilT* mutant led to the formation of shear stress resistant colonies (data not shown) confirming that aggregative properties of the *pilT* mutant are sufficient to explain the absence of detachment upon shear stress application.

Here we show that deletion of a single pilin-like protein PilV severely affects signaling although retraction and twitching motility are not affected in this mutant (not shown and [14]). Pilin-like proteins are thought to insert in the pilus fiber primarily composed

of the major pilin PilE. Three such proteins are described in the *Neisseria* spp., PilX [11], ComP [13] and PilV [14]. Colocalization of the protein with the pilus fiber has been demonstrated directly for PilX by immunogold labeling and electron microscopy and this protein is necessary for bacteria-bacteria aggregation [11,12]. ComP is necessary for the natural competence of *N. meningitidis* and *N. gonorrhoeae*, probably for the initial step of DNA uptake. In *Neisseria gonorrhoeae*, it was found that the *pilV* mutant is deficient for adhesion although shear stress was not applied [14]. This apparent discrepancy with our results could be due to a difference between bacterial species or to reproducible differences in experimental technique. We found that fixing samples with glutaraldehyde, as was done in the Winter-Larsen *et al.* study, rendered microcolonies formed by the *N. meningitidis* *pilV* mutant sensitive to washing procedures, suggesting although not proving the two organisms do manifest the same *pilV*-related properties. We found that in the absence of PilV in *N. meningitidis*, type IV pili are unable to trigger efficient reorganization of the host cell membrane. Our results do not formally exclude the possibility that in addition to its defect in inducing a cellular response, the *pilV* mutant also has an aggregation defect revealed by the application of mechanical stress. Further biophysical studies will be needed to address this point. The simplest model to explain the role of PilV in the induction of the cellular response, is that PilV integrates in the pilus fiber outside of the bacterial body and interacts with a receptor on the cellular surface, which in turn stimulates a cellular signaling pathway leading to the reorganization of the cellular surface. Current efforts are focused on demonstrating this direct relationship and identifying a target receptor.

The signaling pathway triggered by type IV pili leading to the formation of cellular protrusions displays distinct properties from the classical pathway for actin-dependent filopodia formation. The actin cytoskeleton has been shown to participate in the pili-dependent process but inhibition of filamentous actin with cytochalasin D or Latrunculin A does not reduce the ability of bacteria to recruit Ezrin or to trigger the formation of cellular projections ([18] and data not shown). Although it is difficult to formally exclude a role for the actin cytoskeleton in the *N. meningitidis*-induced cellular response, our results do suggest that this bacterium takes advantage of unusual cellular pathways to initiate the response. Consistent with its lack of effect on the bacteria-induced cellular projections, cytochalasin D did not render microcolonies sensitive to mechanical stress (data not shown). In contrast, we show here that removing cholesterol from the plasma membrane has a strong effect on the ability of the bacteria to trigger a response and that cholesterol is abundantly recruited below bacterial microcolonies. The recruitment of CD44 [18], src kinase [21] and ezrin under microcolonies also supports a role for lipid microdomains, as these proteins are typically found in these structures. Interestingly, lipid rafts are known to be necessary for a growing list of signal transduction pathways, some of which could be involved in the bacteria-induced process investigated here [25]. Alternatively the effect of cholesterol depletion could be through a modification of the biophysical properties of the membrane. In any case, several pathogens are known to interact with lipid rafts at different stages during the course of pathogenesis [27]. Related to this study, rafts are also important for the initial adhesion of individual bacteria, for instance in the case of the Internalin A-dependent interaction of *Listeria monocytogenes* with host cells [28] or the example of the initial interaction of *Shigella flexneri* with host cells [29]. In other instances, rafts were found to be necessary for invasion of host cells or for intracellular survival [27].

Interaction of *N. meningitidis* with endothelial cells is a new illustration of how bacteria have evolved to exploit host cell function. Intracellular bacteria are known to directly divert cellular pathways to generate a safe niche for the bacteria. In the case of extracellular

bacteria such as *N. meningitidis*, adhesion is generally viewed as a passive process reduced to adhesin-receptor interaction [30]. Our results show that even in the case of extracellular bacteria, an intense dialogue takes place with host cells and that the nature of this dialogue influences the properties of the interaction. Interestingly *N. meningitidis* is not the only pathogen to induce the formation of cellular protrusions while proliferating on the cellular surface. The Gram-positive bacterium *Streptococcus pyogenes* (group A Streptococcus) responsible for streptococcal sore throat and invasive soft tissue infection was also found to induce the formation of cellular projections while proliferating at the epithelial surface [16]. Another example is *Bartonella henselae*, a Gram-negative bacillus responsible for the formation of tumors on the skin surface characterized by proliferating endothelial cells associated with clumps of bacteria. Colonization of endothelial cells by aggregates of *B. henselae* is associated with the formation of cellular projections closely resembling those observed with *N. meningitidis* [17]. In contrast to other apicomplexans, the parasite *Cryptosporidium* resides in an extracytoplasmic parasitophorous vacuole on the cellular surface [31]. After adhesion, long and thick microvilli that cluster around developing trophozoites are analogous to the cellular projections induced by *N. meningitidis*. Furthermore, host cell membrane reorganization and attachment is also dependent on lipid microdomains [32]. The “pericellular” lifestyle adopted by *N. meningitidis* could be a general process adopted by various pathogens. It will be of interest to test whether certain viruses could also utilize a similar strategy. In any case our results provide a framework for the analysis of the functional significance of pathogen-induced host cell membrane reorganization: these cellular responses provide mechanical resistance to the harsh conditions encountered by extracellular pathogens in their hosts.

From the evolutionary point of view, properties of *N. meningitidis* are positively selected to favor their life in the nasopharynx [33] and certain of these properties then play an important role in the context of pathogenesis. Processes described here can be viewed as the result of such evolutionary pressure. Under pressure to survive in the nasopharynx, *N. meningitidis* has evolved a mechanism to maintain adhesion of microcolonies on the epithelial surface despite harsh mechanical conditions. This adaptive feature becomes a key virulence factor when the bacterium enters the blood and adheres to the cerebral endothelium before invading the brain.

Materials and Methods

Reagents and antibodies

Ezrin was detected using selective rabbit polyclonal antisera kindly provided by P. Mangeat (CNRS, Montpellier, France). DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) and secondary antibodies directed against rabbit or mouse IgG with Alexa 488 or 564 were purchased from (Molecular Probes, Eugene USA). Mowiol, Methyl- β -cyclo-dextrin (MBCD) for cholesterol depletion, MBCD-cholesterol for cholesterol repletion, Filipin, Cytochalasin D and Nocodazole were purchased from Sigma (Sigma, Saint Louis, USA).

Bacterial strains and growth conditions

N. meningitidis 8013 clone 12 is a serogroup C clinical isolate, expressing a class I SB pilin, Opa-, Opc-, PilC1+/PilC2+ as described previously [34]. *N. meningitidis* was grown on GCB agar plates (Difco) containing Kellogg's supplements and when required, 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ kanamycin, 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ erythromycin, 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ spectinomycin or 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ chloramphenicol at 37°C in moist atmosphere containing 5% CO₂. *Escherichia coli* transformants were grown on liquid or solid Luria-Bertani medium (Difco) containing 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ chloramphenicol, 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ spectinomycin or

200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ erythromycin when necessary. Mutation in the *pilV* gene was introduced into the *N. meningitidis* chromosome by natural transformation of chromosomal DNA extracted from a library of transposition mutants described elsewhere [35]. To complement the *pilV* mutants, the WT *pilV* allele was amplified using primers PilV1 5'-TTAATTAAAGGAGTAATTTTATGAAAAACGTTCAAA-AAGGC-3' and PilV2 5'-GTTTAAACTTAGTCGAAGCCGG-GGCAG-3', which contained overhangs with underlined restriction sites for *PacI* and *PmeI* and cloned in the PCR2.1Topo plasmid. This fragment was restricted with *PacI* and *PmeI* and cloned into *PacI*/*PmeI*-cut pGCC4 vector, adjacent to lacIOP regulatory sequences [36]. This placed *pilV* under the transcriptional control of an IPTG inducible promoter within a DNA fragment corresponding to an intragenic region of the gonococcal chromosome conserved in *N. meningitidis*. The *pilV_{ind}* allele was then introduced into the chromosome of a *pilV* mutant by homologous recombination. *N. meningitidis* was made to express the green fluorescent protein (GFP) by introducing the pAM239 plasmid by conjugation [4]. To generate the *comP* mutant a portion of the open reading frame was amplified with primers ComP88Fndc 5'-GCATATGTATCGCAATTATGTTGAGAAAG-3' and 5'-TGGATCCCTACTTAAGTAACTTGCAGTCCTT-3'. This *NdeI* and *BamHI* restricted PCR fragment was cloned into pET14b plasmid (Novagen). The resulting plasmid was restricted with *PmeI*, the blunted spectinomycin cassette [37] was ligated at this site thus interrupting the open reading frame and the resulting plasmid used to introduce the mutation in *N. meningitidis* by transformation. The *pilT* mutant was described elsewhere [38].

Cell culture

Cells were grown at 37°C in a humidified incubator under 5% CO₂. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs; Promo-Cell, Heidelberg, Germany) were used between passages 1 and 8 and grown in Endo-SFM supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria), 2 mM L-Glutamine (Life-Technologies, Grand Island, USA), 0.5 UI/ml of heparin and 40 $\mu\text{g/ml}$ of endothelial cell growth supplement (Harbor Bioproducts, Norwood, USA). The human endometrial cell line Hec1B (HTB113) was purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, Md.) and maintained in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (PAA Laboratories).

Immunofluorescence

Cells were plated at a density of 10^5 cells/cm² onto 12-mm diameter glass coverslips coated with fibronectin (10 $\mu\text{g/ml}$ in PBS for 60'). Before the assay, bacteria grown on GCB agar plates were adjusted to OD₆₀₀ = 0.05 and then incubated for 2 hours at 37°C in prewarmed RPMI supplemented with 10% FBS. Approximately 10^7 bacteria in culture medium were added to 10^5 cells/well in a 24-well (MOI = 100), allowed to adhere for 30 min, unbound bacteria were washed away and infection was allowed to proceed. At the indicated times, monolayers were processed for immunofluorescence assays. For cytochalasin D, Nocodazole and MBCD treatments, the drug was maintained throughout the entire infection period in culture medium at the indicated concentrations. After infection, cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde in PBS for 20 min, permeabilized for 5 min with 0.1% Triton $\times 100$ in PBS and then saturated for 20 min with PBS containing 0.2% gelatin (PBSG) before incubation for 1 hour with the primary antibodies diluted in PBSG. Ezrin anti-serum was diluted 1/1000 (A kind gift from Paul Mangeat, Montpellier, France). Cells were then washed with PBS and incubated for 1 hour in PBSG with anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies

conjugated with Alexa 488 (5 $\mu\text{g/ml}$). DNA was stained with DAPI at a concentration of 100 ng/ml. For cholesterol labeling, Filipin was added after fixation at a concentration of 20 $\mu\text{g/ml}$. Finally, cells were washed 3 times in PBS and mounted in Mowiol. For quantification, efficiency of recruitment was determined as a recruitment index defined as the percentage of microcolonies efficiently recruiting a given cellular protein. Experiments were performed in triplicate and 50–100 microcolonies were counted for each point.

Laminar flow chamber experiments

Experiments using the laminar flow chamber were done essentially as described [4]. Endothelial (HUVEC) or epithelial (HEC1b) cells were grown on fibronectin-coated glass slides at a concentration of 10^4 cells on a 6 mm diameter circular area. Alternatively, disposable flow chambers were used (Ibidi GmbH, München, Germany). Before the assay, bacteria grown on GCB agar plates were adjusted to OD₆₀₀ = 0.02 in prewarmed RPMI medium containing 10% fetal bovine serum and incubated for 90 min at 37°C. GFP expression was induced by adding 1 mM IPTG in the culture medium for an additional 90 min. Cells were infected with 10^6 bacteria (MOI = 100), adhesion allowed to proceed for 30 min, unbound bacteria washed and infection continued for 2–3 h in an incubator. Infected cells on the glass slide were then placed in a parallel plate flow chamber (3.3 cm \times 0.6 cm \times 250 μm , Immunetics, MA, USA) and sealed with vacuum or the Ibidi chamber was placed directly in flow. Medium was maintained at 37°C with a heated platform (Minitub, Germany) and introduced into the chamber using a syringe pump (Vial Medical, Becton-Dickinson or Harvard Apparatus) at various flow rates to produce various wall shear stress levels, using Endo-SFM supplemented with 10% FBS for HUVECs or DMEM supplemented with 10% FBS for Hec1b. Adhesion of bacteria was recorded using an Olympus CKX41 inverted microscope with a 20 \times objective, equipped with a shutter for the fluorescence lamp and a Hamamatsu ORCA285 CCD camera. The Openlab software (Improvision, UK) controlled the shutter and camera for video time-lapse microscopy. The field under observation corresponded to 425 μm by 320 μm with a resolution of 0.63 μm per pixel. To determine the effect of shear stress on bacterial adhesion a plating assay was performed. Infected cells were detached by Trypsin treatment, collected, serial dilutions performed and a fraction was plated on GCB agar plates.

Estimation of the force exerted on a single bacterium and on a colony adhering to the cellular monolayer in the flow chamber was determined according to Goldman *et al.* [24]. For a static bead next to a wall within the boundary layer, an expression of the force for a static bead next to a wall within the boundary layer is given by $F = 1.7005 \times 6\pi\mu r^2\gamma$ where μ is viscosity of the fluid, r the bead radius and γ the shear rate.

Analysis of the mechanical properties of bacterial colonies in absence of cells

Before the assay, bacteria grown on GCB agar plates were adjusted to OD₆₀₀ = 0.05 and then incubated for 2 hours at 37°C in pre-warmed RPMI supplemented with 20% FBS with gentle agitation. The bacterial suspension was concentrated to OD = 0.6 by a 1 min centrifugation at 15000 g followed by resuspension and vortex. Aggregation was then allowed to occur for a period of 30' in the incubator. For the cone and plate assay, about 150 μl of culture was introduced into a cone and plate rheometer (Brookfield Engineering Laboratories Inc., Middleboro, MA, USA) and submitted to different levels of shear stress (0–10 dynes/cm²). Bacteria were then collected and observed micro-

scopically with a 4× lens in a glass bottom 96-well plate (Nunc, Rochester, USA). Aggregate size and number were determined with the Image.J software [39]. For the immobilization of bacterial colonies on a glass slide, the 20D9 monoclonal antibody [40] was adsorbed on the glass surface for 60 minutes in PBS at a concentration of 10 µg/ml. The coated glass slide was placed in the flow chamber, bacteria introduced and incubation for periods of 4–6 hours allowed bacterial proliferation. Shear stress was introduced with a syringe pump and images were captured as described above.

Electron microscopy

For transmission electron microscopy, cells grown on collagen coated, 0.3 mm pore Transwells (Costar) were infected as described above and were fixed overnight at 4°C with a 1:1 mixture of 2.5% glutaraldehyde and 2.5% paraformaldehyde in cacodylate sucrose buffer (0.1 M cacodylate, 0.1 M sucrose, 5 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, pH 7.2). Monolayers were then stained for 1 hour in a solution of 1% OsO₄ and placed for 1 hour in 1% uranyl acetate. After dehydration in a graded series of alcohols, cells were embedded with polyester filter in Epon. Thin sections were obtained by using an Ultracut ultramicrotome and analyzed with JEOL-100CX electron microscope.

For scanning electron microscopy, infected cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) 1 h at room temperature. Samples were washed three times for 5 min in 0.2 M cacodylate buffer (pH 7.2), fixed for 1 h in 1% (wt/vol) osmium tetroxide in 0.2 M cacodylate buffer (pH 7.2), and then rinsed with distilled water. Samples were dehydrated through a graded series of 25, 50, 75 and 95% ethanol solution (5 min each step). Samples were then dehydrated for 10 min in 100% ethanol followed by critical point drying with CO₂. Dried specimens were sputtered with 10 nm gold palladium, with a GATAN Ion Beam Coater and were examined and photographed with a JEOL JSM 6700F field emission scanning electron microscope operating at 5 Kv. Images were acquired with the upper SE detector (SEI).

SDS-PAGE, antisera, and immunoblotting

Preparation of protein samples, SDS-PAGE separation, transfer to membranes and immunoblotting were performed using standard biochemistry techniques [41]. To raise antibodies against PilV, we amplified a PCR product corresponding to the *pilV* gene devoid of its N-terminal sequence encoding the first 26 residues of the *Neisseria gonorrhoeae* PilV preprotein. We used primers PilV forward primer 5'-AGAATTCTACATCCGGCGCGCCCGC-CTG-3' and PilV reverse primer 5'-ATACTGCAGTTAGTC-GAAGCCGGGGC-3', which contained overhangs corresponding to underlined restriction sites for EcoRI and PstI, respectively. The PCR product was first cloned into pCRII-TOPO (Invitrogen, USA) and then excised from pCRII-TOPO with EcoRI and PstI, and subcloned into pMAL-p4x (New England Biolabs, USA) already digested by EcoRI and PstI. The final construct contains

the coding sequence for maltose binding protein fused upstream and in-frame with the truncated *pilV*. The protein was expressed in *E. coli* BL21::DE3, purified using maltose-agarose, digested with factor X and submitted to ion exchange chromatography. The protein was injected into New Zealand rabbits (Centre Lago, Vonnas, France). For western blot detection, anti-PilV serum was diluted 1/2000 in PBS containing 0.1% Tween20 and 1% milk, secondary antibody HRP-linked anti IgG antibodies was diluted in the same buffer 1/10000. Detection of immobilized antigens was performed by chemiluminescence using ECL Plus detection reagents (Amersham biosciences).

Supporting Information

Video S1 Video microscopy analysis of the resistance of microcolonies formed by a wild type strain of *N. meningitidis* on endothelial cells. Endothelial cells forming a confluent monolayer on a glass slide were infected with a GFP expressing strain for a period of 3 h and placed in a flow chamber under. Unbound bacteria were removed in the presence of low intensity shear stress (0.04 dynes/cm²). Shear stress was increased to 10 dynes/cm². Bacteria forming a microcolony of average size were followed using a time-lapse video microscopy. The video is accelerated 20 times; real time duration is 1 min. The arrow indicates time and direction of application of flow.

Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1000314.s001 (1.06 MB MOV)

Video S2 Analysis of the resistance of microcolonies formed by a wild type strain of *N. meningitidis* on endothelial cells treated with 6 mM MβCD.

Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1000314.s002 (0.87 MB MOV)

Video S3 Effect of shear stress on colonies formed by the *pilV* strain.

Found at: doi:10.1371/journal.ppat.1000314.s003 (1.13 MB MOV)

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr. Vladimir Pelicic for long-term collaborative interactions and helpful discussions. The authors are also grateful to Javier Pizarro-Cerda for suggesting the use of MβCD in our system, Dr. Que Lan for assistance in subcloning the PilV gene into the target expression vector, Paul Mangeat for providing Ezrin anti-serum, and Ana Maria Lennon-Dumenil and Marek Drab for critical reading of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GM MS EM NH XN GD. Performed the experiments: GM MS EM NH SG GD. Analyzed the data: GM MS EM NH XN GD. Contributed reagents/materials/analysis tools: NH DD KTF PCM SG MCP GD. Wrote the paper: KTF GD.

References

- Cooke BM, Buckingham DW, Glenister FK, Fernandez KM, Bannister LH, et al. (2006) A Maurer's cleft-associated protein is essential for expression of the major malaria virulence antigen on the surface of infected red blood cells. *J Cell Biol* 172: 899–908.
- Thomas WE, Trintchina E, Forero M, Vogel V, Sokurenko EV (2002) Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force. *Cell* 109: 913–923.
- Antia M, Herricks T, Rathod PK (2007) Microfluidic Modeling of Cell-Cell Interactions in Malaria Pathogenesis. *PLoS Pathog* 3: e99. doi:10.1371/journal.ppat.0030099.
- Mairey E, Genovesio A, Donnadieu E, Bernard C, Jaubert F, et al. (2006) Cerebral microcirculation shear stress levels determine *Neisseria meningitidis* attachment sites along the blood-brain barrier. *J Exp Med* 203: 1939–1950.
- Caugant DA, Tzanakaki G, Kriz P (2007) Lessons from meningococcal carriage studies. *FEMS Microbiol Rev* 31: 52–63.
- Nassif X, Bourdoulous S, Eugene E, Couraud PO (2002) How do extracellular pathogens cross the blood-brain barrier? *Trends Microbiol* 10: 227–232.
- Swanson J (1973) Studies on gonococcus infection. IV. Pili: their role in attachment of gonococci to tissue culture cells. *J Exp Med* 137: 571–589.

8. Wolfgang M, van Putten JP, Hayes SF, Dorward D, Koomey M (2000) Components and dynamics of fiber formation define a ubiquitous biogenesis pathway for bacterial pili. *Embo J* 19: 6408–6418.
9. Winther-Larsen HC, Wolfgang M, Dunham S, van Putten JP, Dorward D, et al. (2005) A conserved set of pilin-like molecules controls type IV pilus dynamics and organelle-associated functions in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* 56: 903–917.
10. Carbonnelle E, Helaine S, Nassif X, Pelicic V (2006) A systematic genetic analysis in *Neisseria meningitidis* defines the Pil proteins required for assembly, functionality, stabilization and export of type IV pili. *Mol Microbiol* 61: 1510–1522.
11. Helaine S, Carbonnelle E, Prouvensier L, Beretti JL, Nassif X, et al. (2005) PilX, a pilus-associated protein essential for bacterial aggregation, is a key to pilus-facilitated attachment of *Neisseria meningitidis* to human cells. *Mol Microbiol* 55: 65–77.
12. Helaine S, Dyer DH, Nassif X, Pelicic V, Forest KT (2007) 3D structure/function analysis of PilX reveals how minor pilins can modulate the virulence properties of type IV pili. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 15888–15893.
13. Wolfgang M, van Putten JP, Hayes SF, Koomey M (1999) The comP locus of *Neisseria gonorrhoeae* encodes a type IV prepilin that is dispensable for pilus biogenesis but essential for natural transformation. *Mol Microbiol* 31: 1345–1357.
14. Winther-Larsen HC, Hegge FT, Wolfgang M, Hayes SF, van Putten JP, et al. (2001) *Neisseria gonorrhoeae* PilV, a type IV pilus-associated protein essential to human epithelial cell adherence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 15276–15281.
15. Pries AR, Secomb TW, Gessner T, Sperandio MB, Gross JF, et al. (1994) Resistance to blood flow in microvessels in vivo. *Circ Res* 75: 904–915.
16. Cywes C, Wessels MR (2001) Group A *Streptococcus* tissue invasion by CD44-mediated cell signalling. *Nature* 414: 648–652.
17. Dehio C, Meyer M, Berger J, Schwarz H, Lanz C (1997) Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalisation of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome. *J Cell Sci* 110(Pt 18): 2141–2154.
18. Eugene E, Hoffmann I, Pujol C, Couraud PO, Bourdoulous S, et al. (2002) Microvilli-like structures are associated with the internalization of virulent capsulated *Neisseria meningitidis* into vascular endothelial cells. *J Cell Sci* 115: 1231–1241.
19. Stephens DS, Hoffman LH, McGee ZA (1983) Interaction of *Neisseria meningitidis* with human nasopharyngeal mucosa: attachment and entry into columnar epithelial cells. *J Infect Dis* 148: 369–376.
20. Merz AJ, Enns CA, So M (1999) Type IV pili of pathogenic *Neisseriae* elicit cortical plaque formation in epithelial cells. *Mol Microbiol* 32: 1316–1332.
21. Hoffmann I, Eugene E, Nassif X, Couraud PO, Bourdoulous S (2001) Activation of ErbB2 receptor tyrosine kinase supports invasion of endothelial cells by *Neisseria meningitidis*. *J Cell Biol* 155: 133–143.
22. Kallstrom H, Liszewski MK, Atkinson JP, Jonsson AB (1997) Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* 25: 639–647.
23. Howie HL, Glogauer M, So M (2005) The *N. gonorrhoeae* type IV pilus stimulates mechanosensitive pathways and cytoprotection through a pilT-dependent mechanism. *PLoS Biol* 3: e100. doi:10.1371/journal.pbio.0030100.
24. Goldman AJ, Cox RG, Brenner H (1967) Slow viscous motion of a sphere parallel to a plane wall. II. Couette flow. *Chem Eng Sci* 22: 653–660.
25. Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 31–39.
26. Biais N, Ladoux B, Higashi D, So M, Sheetz M (2008) Cooperative retraction of bundled type IV pili enables nanonewton force generation. *PLoS Biol* 6: e87. doi:10.1371/journal.pbio.0060087.
27. Lafont F, van der Goot FG (2005) Bacterial invasion via lipid rafts. *Cell Microbiol* 7: 613–620.
28. Seveau S, Bierné H, Giroux S, Prevost MC, Cossart P (2004) Role of lipid rafts in E-cadherin- and HGF-R/Met-mediated entry of *Listeria monocytogenes* into host cells. *J Cell Biol* 166: 743–753.
29. Lafont F, Tran Van Nhieu G, Hanada K, Sansonetti P, van der Goot FG (2002) Initial steps of *Shigella* infection depend on the cholesterol/sphingolipid raft-mediated CD44-IpaB interaction. *Embo J* 21: 4449–4457.
30. Dumenil G, Nassif X (2005) Extracellular bacterial pathogens and small GTPases of the Rho family: an unexpected combination. *Curr Top Microbiol Immunol* 291: 11–28.
31. Borowski H, Clode PL, Thompson RC (2008) Active invasion and/or encapsulation? A reappraisal of host-cell parasitism by *Cryptosporidium*. *Trends Parasitol*.
32. Nelson JB, O'Hara SP, Small AJ, Tietz PS, Choudhury AK, et al. (2006) *Cryptosporidium parvum* infects human cholangiocytes via sphingolipid-enriched membrane microdomains. *Cell Microbiol* 8: 1932–1945.
33. Taha MK, Deghmane AE, Antignac A, Zarattonelli ML, Larribe M, et al. (2002) The duality of virulence and transmissibility in *Neisseria meningitidis*. *Trends Microbiol* 10: 376–382.
34. Nassif X, Lowy J, Stenberg P, O'Gaora P, Ganji A, et al. (1993) Antigenic variation of pilin regulates adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells. *Mol Microbiol* 8: 719–725.
35. Geoffroy MC, Floquet S, Metais A, Nassif X, Pelicic V (2003) Large-scale analysis of the meningococcus genome by gene disruption: resistance to complement-mediated lysis. *Genome Res* 13: 391–398.
36. Mehr IJ, Long CD, Serkin CD, Seifert HS (2000) A homologue of the recombination-dependent growth gene, *rdgC*, is involved in gonococcal pilin antigenic variation. *Genetics* 154: 523–532.
37. Prentki P, Krisch HM (1984) In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* 29: 303–313.
38. Pujol C, Eugene E, Marceau M, Nassif X (1999) The meningococcal PilT protein is required for induction of intimate attachment to epithelial cells following pilus-mediated adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4017–4022.
39. Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11: 36–42.
40. Pujol C, Eugene E, de Saint Martin L, Nassif X (1997) Interaction of *Neisseria meningitidis* with a polarized monolayer of epithelial cells. *Infect Immun* 65: 4836–4842.
41. Harlow E, Lane D (1988) Antibodies: a laboratory manual; Press C, ed.

B. Deux pilines mineures sont nécessaires pour déclencher la réorganisation du cytosquelette d'actine induite par *N. meningitidis*

Notre étude précédente a montré que la formation des projections membranaires à la surface de la cellule hôte joue un rôle essentiel dans la capacité du méningocoque à coloniser son environnement naturel. Nous avons également montré que PilV, probable piline mineure des Pt4, joue un rôle dans l'induction du remodelage de la membrane plasmique. Cependant, il existe une capacité résiduelle à déclencher la réponse cellulaire en absence de PilV. Comme notre étude et celle de A.J. Merz et coll. le suggèrent, les Pt4 semblent au centre de l'induction (Merz *et al.*, 1999). Nous avons donc approfondi notre étude en nous focalisant sur le rôle des Pt4 dans l'induction de la réorganisation du cytosquelette d'actine.

I. Rôle des Pt4 dans le déclenchement de la réorganisation du cytosquelette d'actine

1. Stratégie expérimentale

Pour tester le rôle des Pt4, nous avons décidé d'observer la capacité de bactéries non piliées à déclencher la réponse cellulaire. Cependant, des bactéries non piliées n'adhèrent pas aux cellules humaines en quantité suffisante pour déclencher une réponse cellulaire observable. Par conséquent, pour augmenter la quantité de bactéries adhérentes en absence de pili, nous avons tiré profit de l'existence d'autres adhésines chez *N. meningitidis* : les

protéines Opa. Ces protéines permettent une adhésion efficace des bactéries en absence de pili et de capsule. L'expression des gènes *opa* est soumise à une variation de phase de type « on/off ». Ils sont majoritairement en phase *off* dans notre souche d'étude (2C43).

Nous avons sélectionné dans cette souche des bactéries exprimant des protéines Opa (Opa+), puis nous avons introduit une mutation dans un gène essentiel à la synthèse de la capsule (*siaD*) pour exposer ces protéines membranaires (Caps-).

Chez les *Neisseria*, l'expression de nombreux gènes codant des structures de surface est soumise à une variation de phase. Un risque de cette méthode est donc de sélectionner accidentellement un clone dont certains gènes, impliqués dans le phénotype étudié, ne s'exprimeraient plus. Nous avons donc sélectionné et caractérisé trois clones différents, pour leur capacité à recruter les protéines de la plaque corticale sous les colonies, ainsi que leur capacité à adhérer aux cellules avec ou sans pili (Figure 26). Aucune différence n'est apparue entre ces clones. L'adhésion dépendante des protéines Opa est intermédiaire entre une souche exprimant des pili et une souche sans pili (Pili-). La capacité des trois clones à déclencher le recrutement de protéines comme l'eitrine est comparable à la souche parentale. Comme la variation antigénique de la piline pourrait modifier les propriétés des pili, nous avons également vérifié le variant de piline exprimé. Pour cela nous avons utilisé un anticorps monoclonal dirigé contre la piline PilE spécifique du variant de piline SB exprimé dans notre souche d'étude originelle (Nassif *et al.*, 1993). Une détection directe par immunomarquage confirme que ce même variant de piline est exprimé dans les clones sélectionnés (résultat non illustré).

Nous avons ensuite choisi un de ces clones pour notre étude. Le séquençage des gènes *opa*, a permis de définir que le gène *opaB* est en phase *on* dans ce clone. Ce clone, baptisé Caps-Opa+, est devenu la souche de référence dans le travail qui suit.

2. L'expression des pili est nécessaire au recrutement de la plaque corticale

Pour tester le rôle des pili dans la réponse cellulaire, nous avons observé la capacité de souches n'exprimant pas de pili à recruter la plaque corticale. En effet, le remodelage de la membrane plasmique et le recrutement de la plaque corticale sont deux phénotypes associés à cette réponse cellulaire. Cependant, l'étude du recrutement de protéines nous permet une

analyse quantitative du phénotype contrairement à l'observation du remodelage de la membrane par microscopie électronique à balayage. Pour cette étude, nous avons choisi des cellules endothéliales vasculaires de cordon ombilical humain (Huvec) comme modèle de cellules hôte. Ces cellules sont un modèle classique de cellules vasculaires très bien caractérisées. De plus, la formation des filopodes à la surface des cellules ne peut pas être confondue avec les microvillosités présentes sur les cellules épithéliales. La réponse cellulaire est mesurée par une mesure de la fréquence à laquelle les colonies bactériennes recrutent un marqueur protéique : l'eitrine. Cette protéine est, en effet, recrutée en abondance sous les microcolonies bactériennes donc facilement détectable. De plus, les travaux de E. Eugène montrent que cette protéine est recrutée précocement dans la plaque corticale et nécessaire à l'établissement des filopodes (Eugene *et al.*, 2002). Cette réponse cellulaire est également visualisée par observation directe de la membrane plasmique avec un microscope électronique à balayage.

Nous avons introduit une mutation au locus de *pilE* dans la souche Caps-Opa+. Cette mutation abolit l'expression des Pt4 à la surface des bactéries. Nous avons ensuite infecté des cellules en culture avec la souche de référence ou le mutant n'exprimant pas Pile (Figure 26). La souche de référence, Caps-Opa+(Pili+), forme des microcolonies capables de recruter efficacement l'eitrine en nid d'abeille (Figure 26 C). Une analyse quantitative montre qu'un nid d'abeille d'eitrine est observable pour près de 90% des microcolonies (Figure 26 B). La souche n'exprimant pas de pili adhère aux cellules mais ne forme pas de microcolonies au sens propre (Figure 26 A et C). La présence de Pt4 est effectivement nécessaire à l'agrégation et donc à la formation de microcolonies. Cependant, la souche non piliée, Caps-Opa+Pili-, adhère en quantité suffisante pour observer des « groupes » de bactéries adjacentes qui devraient être capables de déclencher un recrutement d'eitrine. Ces « groupes » ne déclenchent jamais de réponse cellulaire (Figure 26B et C). Conformément à l'hypothèse proposée par A.J. Merz et coll., et par nous-même, la présence de Pt4 est nécessaire pour observer une réorganisation du cytosquelette d'actine sous les bactéries (Merz *et al.*, 1999).

II. Rôle des protéines Pil dans la transduction du signal par les Pili de type IV

1. Rôle individuel des protéines « Pil » dans le recrutement de la plaque corticale

Les pili sont des organelles multiprotéiques et multifonctionnels. Notre travail associant une nouvelle fonction aux Pt4, nous avons cherché si certaines des protéines « Pil » étaient impliquées spécifiquement dans le recrutement de la plaque corticale. Plus de 20 protéines « Pil » participent à la biogenèse des Pt4. Cependant, la majorité des ces protéines sont indispensables à l'expression de Pt4 à la surface des bactéries. Dans ce cas, l'absence de pili rend impossible l'étude directe de leur rôle. Nous avons donc testé le rôle des 8 protéines qui ne sont pas indispensables à la présence de Pt4: les deux protéines PilC : PilC1 et PilC2, les trois AAA ATPases : PilT, PilT2 et PilU, et les trois pilines mineures : PilV, PilX et ComP. Les mutants n'exprimant pas les protéines PilX et PilC1 présentent un défaut d'adhésion, nous avons donc construit les mutants des gènes codant ces 8 protéines dans la souche Caps-Opa+. Nous avons ensuite testé, de manière systématique, la capacité des mutants de ces gènes à recruter la plaque corticale marquée par l'eitrine (Figure 27A).

A l'exception du mutant de *pilX* qui forme des « groupes » de bactéries comme la souche non piliée puisqu'il ne forme pas d'agrégats, tous les mutants forment des microcolonies comparables à la souche de référence (résultat non illustré). Parmi les 8 mutants testés, seuls 2 présentent une fréquence extrêmement faible de recrutement de l'eitrine : les mutants de *pilV* et *pilX*. Les mutants n'exprimant pas ComP, PilC2, PilT et PilT2 présentent une fréquence de recrutement comparable à celle de la souche parentale. Le mutant de *pilC1* présente un très léger défaut de recrutement. De manière étonnante, le mutant n'exprimant pas PilU semble présenter une capacité accrue à recruter l'eitrine puisque 100% des colonies sont positives.

Ces résultats apportent de nombreuses informations sur le mode d'action par lequel les Pt4 recrutent la plaque corticale. Ces informations sont donc détaillées dans la suite.

2. La transduction de signal est une fonction indépendante des autres fonctions associées aux pili

Le premier résultat issu de cette analyse systématique concerne les différentes fonctions associées aux pili. Les protéines Pil dispensables à la biogenèse des Pt4 sont souvent associées à une fonction particulière. Il apparaît donc que l'on peut découpler les bases moléculaires des différentes fonctions (Figure 27B).

Compétence et transduction

Conformément à notre étude publiée, le mutant de *comP* ne présente pas de défaut de recrutement de l'eZRine (Mikaty *et al.*, 2009). La compétence naturelle pour la transformation, qui dépend de ComP, n'est donc pas nécessaire à l'induction du recrutement de la plaque corticale.

Adhésion et transduction

Cette étude concorde également avec celle de A.J. Merz et coll. puisque le mutant de *pilC1* est capable de recruter la plaque corticale (Merz *et al.*, 1999). Ce résultat avait été observé qualitativement et est quantifié ici. Le faible défaut de ce mutant suggère que l'adhésion dépendante des pili, même si elle l'influence, n'est pas nécessaire au déclenchement de la réponse cellulaire. Ce résultat signifie que, contrairement à d'autres espèces bactériennes comme *L. monocytogenes*, l'adhésion et le déclenchement de voies de signalisation cellulaire sont indépendants pour le méningocoque.

Rétraction et transduction

Il a été montré chez *N. gonorrhoeae* que la rétraction dépendante de PilT participe à la réorganisation du cytosquelette d'actine (Higashi *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2005b). Dans cette espèce, l'absence de rétraction se traduit par un défaut quantitatif de la fréquence de recrutement et un défaut qualitatif dans la structure du recrutement. Les nids d'abeille caractéristiques ne sont pas correctement structurés sous les colonies bactériennes. Ce défaut apparaît également avec *N. meningitidis* pour qui on observe de manière régulière, mais pas systématique, des nids d'abeille mal structurés dans un mutant de *pilT*. Cependant le défaut quantitatif n'apparaît pas dans notre étude. Il semble donc que, dans notre modèle d'étude, la rétraction participe à l'élaboration de la structure du nid d'abeille sous la colonie mais pas au déclenchement du recrutement des protéines.

Agrégation et transduction

La question du rôle de l'agrégation dans le déclenchement du recrutement de la plaque corticale se pose, puisque le mutant de *pilX*, non agrégatif, présente un défaut fort de recrutement de l'eitrine. Pour tester le rôle de l'agrégation dans le déclenchement de la réorganisation du cytosquelette d'actine, nous avons utilisé un variant de piline Pile particulier : le variant SA. Le variant de piline SA est incapable de former des bundles et donc n'agrège pas (Marceau *et al.*, 1995; Nassif *et al.*, 1993). Nous avons forcé l'expression de ce variant de piline dans notre souche de référence, à la place du variant SB, puis testé sa capacité à recruter l'eitrine. Ce variant de piline présente une diminution modérée de sa capacité à déclencher la réponse cellulaire. Il est difficile de déterminer si ce léger défaut est lié à l'absence d'agrégation ou au variant de piline lui-même. Cependant, l'impact de l'agrégation sur la transduction du signal par les pili reste très modéré.

Finalement, le mutant de *pilV* est motile, agrégatif, compétent, adhérent et a pour seul défaut phénotypique son défaut de réorganisation du cytosquelette. Aucune de ces fonctions n'est donc suffisante pour déclencher la réponse cellulaire.

L'adhésion, la compétence, l'agrégation et la rétraction, quatre fonctions associées aux Pt4, ne sont donc ni nécessaires, ni suffisantes pour déclencher la réorganisation du cytosquelette d'actine. Il existe donc une indépendance fonctionnelle entre toutes ces fonctions et le recrutement de la plaque corticale au sein des pili. Il est donc probable qu'il existe également des bases moléculaires indépendantes pour la fonction signalisatrice des Pt4.

3. Rôle de la protéine PilV dans le recrutement de la plaque corticale

Conformément à notre étude publiée, le mutant n'exprimant pas PilV présente un défaut fort de recrutement de la plaque corticale (Mikaty *et al.*, 2009). Cependant, dans cette nouvelle étude, le défaut est légèrement plus important que dans notre étude précédente. Seule une colonie sur vingt déclenche un recrutement d'eitrine détectable contre une sur cinq précédemment. Nous avons recherché les causes de cette différence.

Tout d'abord, nous avons vérifié que le défaut de recrutement de l'eitrine est bien lié à l'absence de PilV et non à une seconde mutation dans la souche Caps-Opa+. Une copie du

gène *pilV*, sous le contrôle d'un promoteur inducible à l'IPTG, a été introduite dans une région intergénique du chromosome du mutant. L'induction avec de l'IPTG permet la réexpression de PilV dans le mutant. Cette réexpression restaure la capacité du mutant à recruter le marqueur de façon comparable à la souche parentale (Figure 28A). Cela élimine la possibilité que le défaut phénotypique soit lié à une autre cause que l'absence de la protéine étudiée.

La première explication de cette différence de fréquence est fournie par la fonction attribuée au remodelage de la membrane plasmique : nous avons montré qu'un défaut de réorganisation de la surface cellulaire se traduit par un décrochage des microcolonies lorsqu'elles sont soumises à des contraintes physiques. Lors du traitement pendant les expériences d'immunofluorescence, les échantillons biologiques sont soumis à plusieurs lavages qui exercent de telles contraintes sur les colonies. Ce décrochage a effectivement lieu puisque l'on observe régulièrement des reliefs de microcolonies à la surface des cellules. Ces microcolonies incomplètes ne sont pas comptabilisées dans notre protocole d'étude. De telles colonies ne sont pas observables avec la souche de référence Caps-Opa+. En effet, la protéine Opa stabilise les microcolonies à la surface des cellules. Si, pour une même souche, les microcolonies qui ne réorganisent pas le cytosquelette d'actine se décrochent et ne sont pas comptabilisées, alors la fréquence de recrutement augmente artificiellement dans cet échantillon.

Nous avons également vérifié que l'augmentation de ce défaut n'est pas liée à une différence de la quantité de pili exprimés par le mutant dans le clone Caps-Opa+. Pour cela nous avons mesuré la quantité de pili exprimée dans les souches par ELISA en utilisant l'anticorps monoclonal dirigé contre le variant SB de la piline Pile (Figure 28B). En présence de capsule, la quantité de pili du mutant de *pilV* relative à la souche parentale est de 80% (+/- 20%), donc virtuellement identique à cette souche parentale. En absence de capsule la quantité relative de Pt4 est d'environ 60% (+/- 20%). Cette quantité est donc inférieure à celle de la souche parentale. Cependant elle n'est pas significativement inférieure à celle du mutant *pilV* en présence de capsule. Cette réduction de la quantité de pili pour le mutant de *pilV* pourrait également expliquer que la fréquence de recrutement de l'eZRine soit plus faible que dans le contexte génétique Caps-Opa+.

4. Rôle de la protéine PilX dans le recrutement de la plaque corticale

Dans le cas du mutant n'exprimant pas la protéine PilX, le recrutement d'ezrine n'est détectable sous aucune microcolonie. Cependant, le mutant de *pilX* accumule des défauts d'agrégation et d'adhésion qui pourraient expliquer ce défaut de recrutement d'ezrine.

Dans un premier temps, le phénotype du mutant a été vérifié de la même manière que celui du mutant de *pilV*. Une copie du gène *pilX* sous contrôle d'un promoteur inducible à l'IPTG a été introduite dans la même région intergénique. La réexpression du gène permet une complémentation complète du défaut de recrutement d'ezrine. Le phénotype est donc directement imputable à l'absence de la protéine (Figure 29A).

Nos résultats montrent que l'adhésion et l'agrégation ont un impact sur la capacité des bactéries à déclencher la réponse cellulaire. Il existe donc peut être un effet cumulé des deux défauts. Pour tester cet effet, nous avons introduit une mutation au locus *pilC1* dans la souche exprimant la piline SA. Ce mutant accumule donc des défauts d'adhésion et d'agrégation de manière comparable au mutant de *pilX*. Le mutant de *pilC1* qui exprime la piline SA présente un léger défaut de recrutement de l'ezrine comparable à la souche parentale Caps-Opa+pilineSA (Figure 29B). L'influence de l'adhésion et de l'agrégation sur la capacité de transduction du signal par les pili n'est donc pas cumulative. Les défauts d'adhésion et d'agrégation du mutant de *pilX* n'expliquent pas à eux seuls le défaut drastique de recrutement de l'ezrine.

Comme pour le mutant de *pilV*, nous avons quantifié la piliation du mutant de *pilX* (Figure 29C). Nous mesurons une piliation de 50% (+/- 25%) par rapport à la souche parentale pour la souche capsulée. Ce résultat est comparable aux résultats de S. Helaine qui a caractérisé ce mutant (Helaine *et al.*, 2005). Cependant, dans la souche Caps-Opa+, la quantité relative de pili est de 33% (+/- 15%). Il est donc possible que ce défaut de piliation explique l'importance du défaut de recrutement de l'ezrine de ce mutant. Nous avons donc approfondi l'étude du mutant de *pilX* dans la suite.

5. La protéine PilU régule le recrutement de la plaque corticale

De manière surprenante, le mutant n'exprimant pas la protéine PilU exhibe, non pas un défaut de recrutement du marqueur ezrine sous les microcolonies, mais une capacité accrue à recruter cette protéine. Comme l'absence de la protéine PilU ne se traduit par aucun défaut d'adhésion, nous avons caractérisé le mutant n'exprimant pas PilU directement dans la souche 2C43. Dans cette seconde étude, 96% des microcolonies de PilU recrutent l'ezrine contre environ 80% pour la souche parentale (Figure 30A). Comme pour PilV et PilX, ce phénotype est compensable lorsque l'on exprime à nouveau la protéine PilU dans le mutant.

Pour caractériser la fréquence de recrutement des différentes souches, nous comptabilisons des microcolonies comprenant 100 à 200 bactéries. Comme la différence de fréquence de recrutement de l'ezrine entre le mutant et la souche de référence n'est pas très importante, nous avons choisi de caractériser le phénotype de ce mutant en mesurant la fréquence de ce recrutement pour des microcolonies plus petites (Figure 30B). Il apparaît alors que la fréquence de recrutement de l'ezrine pour la souche de référence est quasiment linéaire en fonction de la taille de la microcolonie. Une microcolonie de moins de 10 bactéries ne déclenche pas de réponse observable. A partir de 100 bactéries, plus de 80% des microcolonies déclenchent la réponse cellulaire. En revanche, le mutant de *pilU* présente la même efficacité de recrutement pour des microcolonies composées de 25 bactéries. Il est également fréquent d'observer des anneaux d'ezrine ou d'actine autour de bactéries individuelles pour ce mutant (Figure 30C).

La protéine PilU présente de fortes homologues de séquence avec la protéine PilT, impliquée dans la rétraction des Pt4. Le phénotype du mutant de *pilU* pourrait donc s'expliquer par une fonction similaire de PilU sur la rétraction. L'augmentation de la quantité de pili, responsables du recrutement de la plaque corticale, se traduirait par une augmentation de la fréquence de recrutement par un effet dose. Cependant, une augmentation d'un facteur 10 de la quantité de pili dans le mutant de *pilT* n'a pas cet effet. Nous avons mesuré la quantité de Pt4 dans le mutant de *pilU*, celle-ci est de 120% (+/-30) par rapport à la souche de référence (résultats non illustrés). Il n'y a donc pas d'augmentation significative de la quantité de pili dans le mutant de *pilU*.

Contrairement à PilV et PilX, la protéine PilU semble s'opposer au recrutement de la plaque corticale. Trois protéines agissent donc sur la capacité du méningocoque à recruter la plaque corticale. Cela pose la question du rapport fonctionnel entre ces protéines.

III. PilV et PilX sont nécessaires à la transduction du signal

Le rôle des deux protéines PilV et PilX pose plusieurs questions. D'abord, quel est l'impact de la réduction de la quantité de pili dans les deux mutants sur le recrutement de la plaque corticale ? Ensuite, pourquoi deux protéines semblent partager cette activité redondante et comment s'organisent-elles pour déclencher la réponse cellulaire ?

1. PilV et PilX agissent indépendamment l'une de l'autre sur le recrutement de la plaque corticale

Afin d'aborder cette problématique, nous avons utilisé les propriétés de la mutation de *pilT*. Un mutant n'exprimant pas PilT exhibe dix fois plus de pili que la souche parentale. Cela permet notamment d'augmenter la quantité de pili dans les mutants de *pilV* et *pilX* et de répondre à la question de l'impact de la quantité de pili sur le recrutement de la plaque corticale. De plus cette mutation est connue pour compenser, par des mécanismes moléculaires variables, certaines autres mutations de gènes « *pil* ». En particulier cette mutation restaure l'adhésion et l'agrégation d'un mutant de *pilX* (Helaine *et al.*, 2005). Qu'en est-il du recrutement de la plaque corticale ?

Nous avons donc introduit une mutation au locus *pilT* dans les souches mutées pour *pilV* et *pilX*. Nous avons ensuite quantifié la piliation de ces souches, puis testé le phénotype de ces doubles mutants. Conformément aux résultats obtenus par d'autres groupes, la mutation au locus *pilT* augmente considérablement la quantité de pili de ces souches, nous mesurons par ELISA une piliation de 1000% chez les mutants *pilT*, *pilV/pilT* et *pilX/pilT* par rapport à la souche de référence (résultat non illustré).

Dans ces conditions, il est possible de détecter un recrutement d'eitrine pour les mutants *pilV/pilT* et *pilX/pilT* (Figure 31). Cependant, la fréquence de ce recrutement est inférieure à celle de la souche Caps-Opa+ ou du mutant de *pilT* dans cette souche. De plus, l'aspect de ce recrutement est différent de celui de la souche parentale, les nids d'abeille sont mal structurés. Le défaut de structuration du nid d'abeille dû à la mutation de *pilT* s'additionne donc au défaut de fréquence des mutants de *pilV* et *pilX*.

Les implications de ces résultats sont multiples :

L'absence de rétraction influence la capacité à recruter des protéines comme l'eitrine dans les mutants de *pilV* et de *pilX*. Pourtant, cette absence de rétraction n'augmente pas la capacité du mutant de *pilT* à recruter ces mêmes protéines. Ce n'est donc probablement pas une augmentation du nombre de pili qui est responsable de la compensation des défauts des mutants de *pilV* et *pilX*. Ceci suggère que l'absence de rétraction agit autrement, peut-être en stabilisant une interaction qui serait fragile en absence de PilV ou PilX.

D'autre part, même une quantité de pili 10 fois plus importante que la souche parentale ne permet pas de restaurer un recrutement comparable à cette souche dans les mutants de *pilV* et de *pilX*. Le défaut phénotypique lié à l'absence de PilV est donc toujours observable même s'il est réduit dans ce contexte génétique particulier. De plus, pour le mutant de *pilX*, l'absence de rétraction restaure la piliation mais également l'agrégation et l'adhésion. Ce double mutant ne présente donc plus les défauts phénotypiques du mutant simple à l'exception du défaut de recrutement d'eitrine. Ce résultat confirme donc que PilX participe au déclenchement de la réponse cellulaire indépendamment de ses autres fonctions dans les Pt4.

Finalement, la mutation de *pilT* démontre qu'il existe une capacité résiduelle à recruter la plaque corticale dans les mutants des gènes *pilV* et *pilX*. Nous avons donc testé le triple mutant *pilV/pilX/pilT* (Figure 31). Ce mutant arbore 3 fois plus de Pt4 que la souche parentale (résultat non illustré). Cependant aucun recrutement d'eitrine n'est détectable lors de l'infection avec ce mutant. Ce résultat suggère que la capacité résiduelle à recruter l'eitrine dans le mutant *pilV/pilT* est liée à l'expression de PilX et dans *pilX/pilT* à la présence de PilV. Chacune de ces protéines a donc une capacité intrinsèque à recruter de l'eitrine, indépendamment de la présence de l'autre.

Pour confirmer le phénotype de ces mutants, nous avons testé leur capacité à recruter d'autres protéines connues pour être localisés dans la plaque corticale. Nous avons ainsi testé et confirmé ces différents phénotypes pour le recrutement de CD44, CD46, ErbB2, ICAM1, l'Actine et la Cortactine (résultats non illustrés) (Eugene *et al.*, 2002; Hoffmann *et al.*, 2001;

Lambotin *et al.*, 2005; Merz *et al.*, 1999). Enfin, l'observation directe par microscopie électronique à balayage illustre l'impact de ce défaut de recrutement sur la formation des projections membranaires à la surface des cellules (Figure 31). Une absence de recrutement de la plaque corticale correspond bien à une absence de filopodes au contact des bactéries. Les défauts caractérisés pour les mutants de *pilV* et de *pilX* concernent bien le phénomène dans son entier, la réorganisation du cytosquelette d'actine et ses conséquences membranaires.

Il apparaît donc que ces deux protéines sont nécessaires ensemble pour déclencher la réorganisation du cytosquelette d'actine et la formation de projections membranaires autour des bactéries.

2. Relations fonctionnelles entre PilU, PilV et PilX

Le phénotype du mutant de *pilU* suggère que la présence de la protéine s'oppose au recrutement de la plaque corticale alors que PilX et PilV favorisent ce recrutement. Il était donc intéressant de comprendre quelles relations lient ces trois protéines entre-elles.

Par analogie à la mutation de *pilT*, nous avons introduit une délétion du gène *pilU* dans les mutants de PilV et PilX et dans le double mutant *pilV/pilX*. La capacité à recruter l'eitrine a été testée dans ces différents mutants (Figure 32). De manière surprenante, la perte d'expression de la protéine PilU restaure une capacité quasiment normale de recrutement de l'eitrine pour le mutant de *pilV*, autant en fréquence qu'en structure des nids d'abeille. Par contre, la restauration du phénotype du mutant de *pilX* est partielle en terme de fréquence. Le phénotype de la mutation dans *pilU* est donc épistatique sur celui du mutant de *pilV* et compense partiellement la mutation dans *pilX*.

En revanche, comme pour *pilT*, cette mutation ne restaure pas le phénotype du double mutant *pilV/pilX*. Ce triple mutant *pilV/pilX/pilU* exhibe une piliation relative n'excédant pas 20% de celle de la souche de référence (résultat non illustré). Le phénotype du triple mutant est donc difficile à attribuer aux seules mutations introduites dans PilX et PilV. Cependant, ce résultat suggère que, comme pour la mutation dans *pilT*, le recrutement de l'eitrine dans le mutant *pilV/pilU* est peut-être dû à la présence de PilX et inversement. L'action de PilU sur le recrutement de la plaque corticale serait alors dépendant de la présence de PilV et de PilX.

Le gène *pilU* est situé directement en aval du gène *pilT* sur le chromosome des *Neisseria* pathogènes (Figure 7). Une étude chez le gonocoque montre que ces deux gènes

sont co-transcrits (Park *et al.*, 2002). Comme les phénotypes des deux mutants sont très proches, il est envisageable que la mutation dans *pilT* ait un effet polaire sur l'expression de *pilU*. Nous avons donc testé par western blot l'expression des protéines PilT et PilU dans les différentes souches. Aucun effet polaire n'a été observé, les mutations obtenues dans le gène *pilT* n'ont pas d'effet détectable sur l'expression de PilU et *vice versa* (résultats non illustrés). Les phénotypes observés ici sont donc le fait de la seule protéine PilU comme le suggérait la complémentation fonctionnelle (Figure 32).

Le mode d'action de la protéine PilU n'a pas pu être décrypté durant ma thèse. Malgré d'évidentes homologues de séquence avec PilT ou avec son orthologue chez *P. aeruginosa*, aucune activité de rétraction n'est détectable pour cette protéine chez les *Neisseria*. La suite de ce manuscrit est donc focalisée sur le travail effectué sur les deux pilines PilV et PilX.

IV. Rôle de la région disulfure de PilV et de PilX dans le recrutement de la plaque corticale

1. Rôle de la région disulfure de PilX

Les travaux de Sophie Helaine sur PilX ont montré que la région disulfure de la protéine joue un rôle essentiel dans l'agrégation associée à cette protéine (Helaine *et al.*, 2007). L'hypothèse proposée est que cette région disulfure est exposée à la surface du pilus et permet de stabiliser les interactions antiparallèles entre les pili. Pour tester cette hypothèse, S. Helaine a généré de courtes délétions, correspondant à quelques acides aminés de cette région disulfure, dans la séquence du gène codant PilX (Figure 33A et B). Ces gènes mutés sont introduits dans une région intergénique du chromosome du mutant de *pilX* puis sont exprimés grâce à un promoteur inductible à l'IPTG. Ces travaux démontrent que cette région de la protéine PilX, localisée dans les pili, est nécessaire à la fonction agrégative assumée par PilX.

Cette région disulfure de la protéine étant nécessaire à la fonction de PilX dans l'agrégation, nous avons testé son rôle dans le recrutement de la plaque corticale. Par analogie, nous avons testé le rôle de cette même région dans la protéine PilV.

Nous avons testé le rôle des différentes délétions, construites par S. Helaine au laboratoire, sur le recrutement de l'eZRine. Ces différents gènes délétés ont été introduits dans le mutant Caps-

Opa+*pilX*. Lorsque la bactérie exprime ces constructions, le phénotype varie selon la région délétée (Figure 33C). L'absence des acides aminés 132 à 137 ou 136 à 142 de PilX n'a pas d'effet fort sur la capacité de la souche à recruter l'eitrine. Il est intéressant de remarquer que ces souches sont également parfaitement agrégatives. En revanche, l'absence des 5 acides aminés 126 à 131 a un effet drastique ; la souche se comporte comme si la protéine PilX était absente. Cette souche est pourtant toujours agrégative, ce qui suggère que la protéine est présente et localisée de façon adéquate pour assurer sa fonction dans l'agrégation. Ce résultat est confirmé par une délétion plus large entre les acides aminés 127 et 138. Cette délétion est la seule qui abolit également l'agrégation dépendante de PilX.

L'étude du phénotype de souches exprimant des protéines PilX partiellement délétées a révélé que cette région disulfure joue un rôle dans la fonction de PilX dans l'agrégation mais aussi dans la transduction du signal vers la cellule hôte. De plus, une région minimale de 5 acides aminés est nécessaire pour la fonction de PilX dans le recrutement de l'eitrine mais pas dans l'agrégation. Cela découple les fonctions d'agrégation et de transduction du signal au sein de la protéine PilX.

2. Rôle de la région disulfure de PilV

Nous avons alors testé le rôle de la région disulfure de PilV dans le recrutement de la plaque corticale. Pour cette partie du projet, j'ai eu l'occasion de participer à la formation et à l'encadrement d'une étudiante en deuxième année de Master, Anne-Flore Imhaus, qui a mené le projet sur la région disulfure de PilV. Plutôt que d'introduire dans la protéine PilV, des délétions équivalentes à celles générées dans la protéine PilX, nous avons choisi d'intervertir la région disulfure de PilV avec celle de ComP (Figure 34A). En effet, le statut de probable piline mineure de ComP suppose que cette région est capable de former un pont disulfure équivalent à la région disulfure de PilV. De plus nous savons que la protéine ComP n'a pas de fonction dans le recrutement de l'eitrine (Figure 27). Le gène codant la protéine chimère PilV avec la région disulfure de ComP (*pilV(ComP)*) a été introduit dans le mutant de *pilV*. Cette souche exprime une protéine détectable en western blot en utilisant un anticorps dirigé contre PilV (Figure 34B). Elle présente, comme le mutant n'exprimant pas PilV, un défaut important de recrutement de la plaque corticale (Figure 34C). Comme pour PilX, la région disulfure de PilV semble nécessaire à sa fonction dans la réorganisation du cytosquelette d'actine.

V. PilV est localisée dans des pili

Ces résultats suggèrent que les deux protéines PilV et PilX agissent d'une manière similaire pour déclencher la réorganisation du cytosquelette d'actine. Cependant, pour conclure sur le rôle de PilV, il reste à déterminer si cette protéine, comme PilX, est une piline mineure capable de s'intégrer dans les pili. Il a été montré chez *N. gonorrhoeae* que PilV possède toutes les caractéristiques d'une piline mineure (Winther-Larsen *et al.*, 2001). Cependant PilV n'a jamais été observée dans les pili.

1. La protéine PilV est purifiée avec les Pt4

Si PilV est localisée dans les pili, elle devrait, comme PilX, être détectée dans une préparation enrichie en Pt4. Cette localisation a été montrée chez le gonocoque mais pas chez le méningocoque (Winther-Larsen *et al.*, 2001). Nous avons donc purifié des Pt4 de méningocoque par une méthode mécanique et chimique. La quantité de protéines dans la fraction de pili purifiée est comparée à la quantité totale de protéine dans le lysat cellulaire de départ (Figure 35).

Il apparaît que nous purifions environ 10% de la piline totale par cette méthode. Soit le rendement de la méthode est modeste, soit seule une protéine PilE sur dix est localisée dans un pilus. Ce dernier point est cohérent avec le fait qu'en absence de rétraction, la quantité de Pt4 augmente d'un facteur 10. Il est envisageable que l'essentiel de la piline soit stocké dans le périplasme et non assemblée en pili.

Dans cette préparation de Pt4, il est quasiment impossible de détecter des protéines de la membrane externe comme Rmp4 ou des protéines cytosoliques comme PilU. Cette préparation n'est donc pas contaminée de façon significative par ces deux compartiments de la bactérie. En conformité avec sa localisation dans les Pt4, la protéine PilX est parfaitement détectable dans cette fraction de pili. Pourtant seule 1% de la quantité totale de protéine est localisée dans la préparation. Comme pour PilE, il semble que l'essentiel des pilines mineures

puisse être stockés et non assemblé dans les pili. Nous avons alors mesuré la quantité de PilV et de ComP dans cette fraction de Pt4. Comme pour PilX, près de 1% de la quantité totale des deux protéines PilV et ComP est détectable dans les Pt4. Ce résultat est en accord avec une localisation de PilV dans les Pt4 chez *N. meningitidis*.

2. La protéine PilV est assemblée dans des pili

Nous avons alors souhaité visualiser directement la protéine PilV dans des Pt4. Pour commencer, nous avons tenté la même approche que celle mise en place par S. Helaine et coll. pour PilX (Helaine *et al.*, 2005). Nous avons utilisé un anticorps dirigé contre PilV décrit dans notre publication (Mikaty *et al.*, 2009). La protéine recombinante PilV, fusionnée à la MBP (*Maltose Binding Protein*), a été exprimée et purifiée chez *E. coli*. En théorie, cette protéine est correctement repliée et le pont disulfure essentiel à sa fonctionnalité est formé. Cette protéine nous a permis d'obtenir un anticorps polyclonal contre PilV. Nous n'avons pas réussi à visualiser la protéine PilV par immuno-détection directe en utilisant cet anticorps.

Dans le cadre de son stage de Master, Anne-Flore Ihmaus a alors utilisé la même méthodologie que celle utilisée pour montrer le rôle de la région disulfure dans le recrutement de la plaque corticale. La région disulfure de PilV a été échangée avec une séquence peptidique *Flag* détectable par immunomarquage avec des anticorps commerciaux (Figure 36A). Si la protéine PilV est incorporée dans les pili, et si la région disulfure est accessible, alors il serait possible d'observer un marquage des pili avec ces anticorps commerciaux. L'utilisation d'anticorps dirigés contre la piline SB permet de visualiser des Pt4 (Figure 36B). Les pili forment de longues fibres caractéristiques à l'extérieur des bactéries. Ces fibres font parfois plusieurs micromètres de long. L'utilisation de l'anticorps dirigé contre la région *Flag* permet d'observer des fibres, en tout point comparables aux pili, dans la souche exprimant la protéine chimère en lieu et place de PilV (Figure 36C). Il apparaît que PilV est localisée dans, ou sur, des structures très similaires aux Pt4 du méningocoque. Ces résultats suggèrent que PilV est certainement une piline mineure, intégrée dans les pili du méningocoque.

VI. PilV, mais pas PilX, semble suffisante pour déclencher le recrutement et l'activation de l'ezrine

Au vue des résultats obtenus, il semble que les deux pilines mineures sont exposées à l'extérieur de la bactérie, au contact de la cellule hôte. Elles sont également nécessaires au déclenchement de la réorganisation du cytosquelette d'actine. Il est alors tentant d'envisager une interaction directe entre ces deux pilines mineures et un ou des récepteur(s) membranaire(s) de manière comparable aux Internalines de *Listeria*. Nous avons testé cette hypothèse et des résultats préliminaires suggèrent qu'un tel mode d'action est effectivement possible en ce qui concerne la protéine PilV.

1. Production et purification des pilines

Nous avons choisi de tester le rôle direct de PilV et PilX, en produisant des protéines PilV et PilX recombinantes puis en testant leur activité au contact des cellules eucaryotes. Ces résultats ont encore un caractère préliminaire.

Produire et purifier des pilines nécessite quelques précautions : la région α hydrophobe perturbe la solubilité de ces protéines et la formation du pont disulfure dans leur région C-terminal nécessite une localisation périplasmique. Nous avons décidé de calquer notre approche sur celle utilisée pour produire, purifier et cristalliser d'autres pilines dont PilX (Helaine *et al.*, 2007). Nous avons donc fusionné la piline mineure PilV, déletée d'une partie de sa région α hydrophobe, à la MBP. La MBP présente le double avantage de posséder une séquence d'adressage périplasmique et d'être facilement purifiable grâce à son affinité pour certains sucres. Nous avons utilisé la même stratégie pour produire et purifier les pilines PilE, PilX et ComP (Figure 37A)). Comme nos résultats démontrent que la protéine ComP n'a aucune activité en terme de recrutement et réorganisation du cytosquelette d'actine, nous avons utilisé celle-ci comme contrôle négatif lors des expériences menées. Les différentes fusions sont appelées : MBP-PilE, MBP-PilX, MBP-PilV et MBP-ComP.

2. PilV est suffisante pour recruter de l'eitrine

Dans un premier temps, ces protéines fusionnées, ainsi que la MBP, ont été liées, par couplage covalent, à la surface de billes de latex de 1 μm de diamètre. Ces billes ont été mises au contact de cellules endothéliales humaines. L'activité directe de recrutement de protéines est mesurée de la même manière que pour les bactéries. Pour ces expériences, nous avons choisi d'observer le recrutement de l'eitrine et de l'actine par les protéines liées à la surface des billes.

La première observation est que le recrutement de protéines dépend du nombre de billes sur la membrane cellulaire. Des billes individuelles ne déclenchent que rarement une réponse cellulaire alors que des agrégats d'une centaine de billes déclenchent fréquemment un recrutement d'eitrine et d'actine. Ce recrutement ressemble à celui observé sous un méningocoque mais cette réponse cellulaire se produit quelle que soit la protéine liée aux billes ainsi que pour les billes nues (résultat non illustré).

Cependant, pour des agrégats d'une dizaine de billes, ce recrutement est significativement plus fréquent lorsque les billes sont recouvertes de la protéine MBP-PilV que des protéines MBP, MBP-PilE ou MBP-ComP (Figure 37B et C). Dans ces trois cas, pour des agrégats d'une dizaine de billes, un recrutement non spécifique est observable dans environ 10% des cas. Pour les protéines MBP-PilV et MBP-PilX, cette fréquence atteint respectivement 28% et 22%. Cela suggère que la protéine PilV est capable d'induire le recrutement de l'eitrine et de l'actine seule, indépendamment du bruit de fond observé dans les autres cas. De manière surprenante, même si une tendance similaire est observée pour la protéine PilX, le résultat n'est pas significatif.

3. La présence de PilV déclenche une phosphorylation de l'Eitrine

La seconde expérience a consisté à ajouter directement ces protéines fusionnées dans le milieu de culture des mêmes cellules. Le but est de vérifier si les protéines seules sont capables d'activer des voies de signalisation. Dans ce test, nous avons choisi de regarder la phosphorylation de l'eitrine comme témoin de l'activation de voies de signalisation. Si l'une

des protéines interagit avec un récepteur, alors le recrutement et l'activation de l'eitrine sera probablement l'une des premières étapes du signal déclenché.

Différentes concentrations de protéines ont été testées. Aucune différence significative de phosphorylation de l'eitrine n'est observable entre les quatre protéines en dessous d'environ 2 μ M de protéine. A partir de 2 μ M une augmentation de la phosphorylation de l'eitrine (et de la Moesine) est observable pour les protéines MBP-PilV et MBP-PilE par rapport aux protéines MBP-PilX et MBP-ComP (Figure 37D). Cette augmentation est quantifiée par analyse informatique et varie selon les expériences entre un facteur 2 et 5.

En parallèle, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la MBP montre que les protéines MBP-PilV et MBP-PilE sont beaucoup plus concentrées dans le lysat cellulaire que les protéines MBP-PilX et MBP-ComP. Cela suggère que ces deux pilines adhèrent plus efficacement ou qu'elles sont internalisées dans les cellules. Notons que la protéine MBP-PilX adhère moins que MBP-ComP qui sert de référence négative dans ces expériences. Ce résultat, reproduit plus de trois fois, suggère que les protéines PilV et PilE, indépendamment de la présence de la MBP, adhèrent aux cellules endothéliales humaines et déclenchent une augmentation de la phosphorylation de l'eitrine.

Pour conclure, ce travail a permis de démontrer que deux **pilines mineures**, PilV et PilX, **sont essentielles au déclenchement de la réorganisation du cytosquelette d'actine** par *N. meningitidis*. La région disulfure de ces deux protéines est nécessaire à cette fonction. Une troisième protéine, PilU, régule cette réorganisation du cytosquelette. Son activité pourrait dépendre de PilV et PilX. Les résultats préliminaires obtenus par Anne-Flore Imhaus durant son Master permettent de penser que la protéine PilV est une piline mineure intégrée dans les Pt4. Quoiqu'il en soit, cette protéine est, comme PilX, exposée à l'extérieur de la bactérie en contact direct avec la cellule eucaryote.

Nous avons donc testé le rôle direct des deux protéines PilX et PilV sur le déclenchement de la réponse cellulaire. Il apparaît que PilV pourrait effectivement lier un récepteur cellulaire et déclencher seule le recrutement et la phosphorylation de l'eitrine. La protéine PilX n'a aucune activité directe dans les expériences que nous avons menées. Son mode d'action est donc probablement différent de celui de PilV. La protéine PilE ne déclenche pas de recrutement d'eitrine ou d'actine. Cependant sa présence déclenche une phosphorylation de l'eitrine. Il est donc envisageable que la piline majeure participe directement à la réorganisation du cytosquelette d'actine. Ces résultats exploratoires ouvrent de nouvelles perspectives dans la compréhension de l'interaction entre le méningocoque et les cellules eucaryotes.

IV. MATERIEL ET METHODES

Ce « matériel et méthode » correspond aux travaux présentés dans le chapitre III.B.

Souches et cultures

La souche de référence Caps-Opa⁺ est issu d'un clone de la souche 2C43. La souche 2C43 est elle même issue de la souche de référence 8013 (Geoffroy *et al.*, 2003). 2C43 est une souche du séro groupe C piliée, capsulée, Opa⁻ et Opc⁻ et exprimant un variant antigénique de piline de type SB hyper-adhésif (Nassif *et al.*, 1993). La souche Caps-Opa⁺ a été sélectionné comme il suit : 100 colonies de 2C43 ont été isolées, la présence de protéines Opa a été détectée par western blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre cette famille de protéines, 3 colonies étaient positives. Un clone a été caractérisé par amplification (PCR) et séquençage des quatre gènes *opa* ce qui a permis de déterminer que ce clone exprime la protéine OpaB. Une mutation au locus *siaD* a ensuite été introduite, supprimant l'expression de la capsule. Tous les mutants ont été construits par recombinaison homologue en transformant le clone Caps-Opa⁺ avec de l'ADN chromosomique extrait des souches mutées originelles. La plupart des mutants sont issus d'une banque de mutants décrite dans (Geoffroy *et al.*, 2003). La mutation *pilT* a été construite par délétion du gène entier et porte une résistance à l'érythromycine dans (Pujol *et al.*, 1999). Pour les expériences d'épistasie, la mutation de PilU a été construite par délétion de la même manière que PilT. Les constructions permettant la réexpression de PilV ou de PilX sont décrites dans (Mikaty *et al.*, 2009) et (Helaine *et al.*, 2005). La mutation *comP* a été construite par délétion du gène entier et porte une résistance à la spectinomycine décrit dans (Mikaty *et al.*, 2009). Le variant antigénique SA est décrit dans la littérature (Nassif *et al.*, 1993).

Pour les constructions dans la région disulfure de PilV, la séquence du gène *pilV* encadrée de sites de restriction PmeI et PacI, a été clonée dans le plasmide pCR2.1-TOPO (TOPO TAcloning, Invitrogen). Un site de restriction correspondant à l'enzyme BaeI est introduit dans la séquence se situant entre les deux Cystéines en utilisant le kit de mutagenèse QuickChange Site-Directed (Stratagene). Le plasmide a été digéré par BaeI, les séquences voulues (Région disulfure de Comp ou Flag) ont été insérées et liées avec la ligase T4. La séquence chimère a été excisée en utilisant les enzymes PmeI et PacI et introduite dans le plasmide pGCC4.

Les amorces utilisées sont décrites dans le Tableau 1.

N. meningitidis a été cultivée pendant 16 heures à 37°C en atmosphère humide contenant 5 % de CO₂ sur des boîtes GCB Agar (Difco) contenant les suppléments de

Kellogg's et si besoin des antibiotiques : kanamycine (100 µg/mL), spectinomycine (60 µg/mL), érythromycine (2 µg/mL), chloramphénicol (2 µg/mL).

Extraction de l'ADN chromosomique et transformation

L'ADN de *N. meningitidis* a été extrait à partir de cultures de 16 heures sur GCB Agar grâce au kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) en suivant les recommandations du fabricant.

Pour la transformation, des cultures fraîches de *N. meningitidis* étaient resuspendues dans 1 mL de GCB liquide de transformation (protéose peptone 15 mg/mL, K₂HPO₄ 4 mg/mL, KH₂PO₄ 1 mg/mL, NaCl 5 mg/mL MgSO₄ 2,5 mg/mL, MgCl₂ 2,5 mg/mL) à une densité optique à 600 nm (DO₆₀₀) de 1, soit 10⁹ bactéries/mL. 5 µg d'ADN chromosomique ont été ajoutés à 200 µL de cette suspension dans un puits pour culture cellulaire de 1,2 cm de diamètre. Le mélange a été cultivé à 37°C, 5 % CO₂ pendant 30 minutes sous agitation forte, puis pendant 3 heures sous agitation après ajout de 0,8 mL de GCB de transformation par puits. Les transformants ont été sélectionnés sur GCB Agar contenant l'antibiotique nécessaire, puis congelés à -80°C dans du GCB liquide additionné de glycérol à une concentration de 20 %.

Culture cellulaire

Des cellules endothéliales humaines de veine ombilicale (HUVECs, Human Umbilical Vein Endothelial Cells, PromoCell) ont été utilisées entre les « passages » 3 et 9 et cultivées en Endo-SFM L-glutamine 2 mM (Gibco) complémenté en Sérum de Veau Fœtal (SVF) 10% et en Héparine 1% (Sigma) ajoutés extemporanément. La culture a été faite à 37°C, 5% CO₂, en atmosphère humide. Les expériences avec les protéines MBP-pilines ont été menées sur des cellules hCMEC/D3 en suivant le protocole de culture décrit dans (Weksler *et al.*, 2005). La veille des infections, les cellules ont étéensemencées à 10⁵ cellules/cm² dans des boîtes de culture de 24 puits et incubées à 37°C, 5 % CO₂, en atmosphère humide. Pour les expériences d'immunofluorescence et de microscopie électronique à balayage les cellules HUVECs ont étéensemencées de la même manière sur des lamelles de 12 mm de diamètre préalablement recouvertes de fibronectine (10 µg/mL).

Infections

Le milieu de culture des HUVECs a été remplacé par du milieu frais deux heures avant infection. Après 2 heures de culture sous agitation dans le même milieu, 10^7 bactéries ont été ajoutées pour 10^5 cellules dans les puits (multiplicité d'infection (MOI) = 100). Après 30 minutes, les cellules étaient lavées et recouvertes de milieu frais, pour retirer les bactéries non adhérentes, puis cultivées pendant 2 heures à 37°C, 5 % CO₂, en atmosphère humide. Pour obtenir des colonies de taille comparable à la souche Caps-Opa+ avec les souches non piliées et/ou non adhérentes, 4.10^7 bactéries sont ajoutées pour 10^5 cellules dans les puits (MOI = 400). Après 30 minutes d'infection, les cellules ont été cultivées pendant 4 heures à 37°C, 5 % CO₂, en atmosphère humide. Les cellules infectées ont ensuite été préparées pour les différents traitements de microscopie.

Pour les tests d'adhésion, 10^7 bactéries étaient ajoutées à 10^5 cellules dans les puits (multiplicité d'infection (MOI) = 100). Après 30 minutes, les cellules étaient lavées et recouvertes de milieu frais, puis cultivées pendant 2 heures. Les cellules étaient alors lavées 3 fois avec du milieu frais, grattées puis vortexées. Différentes dilutions de ce bouillon ont été étalé sur milieu GCB, puis les colonies énumérées après 16h de croissance.

Anticorps et réactifs

Nous utilisons des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre l'ezrine (gracieusement fournis par Mangeat P.), contre PilU et contre Erb2 (Hoffmann *et al.*, 2001), et des anticorps monoclonaux de souris dirigés contre les protéines CD46, CD44, ICAM-1 et Cortactine (Eugene *et al.*, 2002; Lambotin *et al.*, 2005) et contre la séquence Flag (Sigma). Les anticorps secondaires anti-Immunoglobuline G (IgG) de lapin ou de souris sont couplés au fluorochrome Alexa-488 (Interchim) ou à la Horse Radish Peroxydase (HRP, Sigma). L'Actine était visualisée par la Phalloïdine couplée à un fluorochrome Alexa-568. Les bactéries étaient visualisées grâce à un intercalant de l'ADN : le DAPI (Sigma). Pour les ELISA, nous utilisons un anticorps monoclonal de souris dirigé contre la piline PileE intégrée dans les PT4 : le 20d9 (Carbonnelle *et al.*, 2005; Helaine *et al.*, 2005). La concentration de travail pour les anticorps en immunofluorescence et en ELISA est de 1 à 5 µg/mL selon l'anticorps. Les westerns blot ont été révélés par kit ECL plus (LumigenTM PS-3) en suivant les recommandations du fabricant.

Immunofluorescence

Les cellules infectées ont été fixées 30 minutes avec du PBS additionné de paraformaldéhyde 4 % (PFA), perméabilisées 1 minute avec du PBS Triton x100 0,1 % et bloquées 20 min en PBS 0,2 % gélatine (PBSG) avant une incubation d'une heure avec les anticorps primaires dilués en PBSG. Les cellules ont été lavées en PBS et incubées 1 heure avec l'anticorps secondaire fluorescent, le DAPI (1/10000) et la phalloïdine (1/200) (si nécessaire) dilués dans le PBSG. Enfin, elles ont été lavées 3 fois en PBS et montées en Moviol (Sigma) avant analyse et comptage avec un microscope à fluorescence (Leica DMRB).

L'indice de recrutement correspond au pourcentage de microcolonies pour lesquelles il est possible de détecter un recrutement de l'Ezrine. Nous avons choisi d'étudier uniquement des microcolonies de taille constante correspondant à environ 100 à 200 bactéries. Les recrutements protéiques dans les cellules HUVECs sous les microcolonies ont été comptés en immunofluorescence de la façon suivante : une plaque corticale complète ou partielle sous la microcolonie était comptée comme positive, une absence de recrutement était comptée comme négative. Au moins 100 colonies ont été comptées pour chaque mutant, les barres d'erreurs (écart type) ont été calculées à partir d'au moins 3 expériences indépendantes.

Microscopie Electronique à Balayage

Les cellules infectées étaient fixées 1 heure avec du glutaraldéhyde 2,5 % dans un tampon 0.1M cacodylate puis lavées 4 fois en PBS. Les échantillons ont été ensuite amenés à la plateforme Microscopie Electronique de l'Institut Pasteur et confiés aux bons soins de S. Guadagnini où ils suivent le traitement suivant : fixation à l'OsO₄ 1% en tampon cacodylate 0.2 M pendant 1 heure, 3 lavages à l'eau, déshydratations successives de 5 minutes à l'éthanol 25, 50, 75, 95 puis 100% (10 minutes) puis dessiccation dans l'acétone. L'observation des échantillons a été faite à l'Institut Pasteur.

ELISA

Pour la quantification des PT4, 100 µL d'une suspension bactérienne en PBS à DO_{600nm} = 0,1 soit 10⁸ bactéries, ont été introduits dans un puit de plaque ELISA 96 puits. Cette solution a été diluée 5 fois en PBS (de 2 en 2) sur cette même plaque. Après une centrifugation de 10 minutes à 700 g, le milieu était retiré et l'excédent laissé à s'évaporer 1h à 55°C, en atmosphère sèche. Les bactéries ainsi fixées ont été lavées trois fois en PBS et

bloquées 10 minutes en PBS 1 % Sérum Albumine Bovine (BSA, Sigma), 0,1 % Tween 20 (Sigma). Puis les bactéries ont été mises en présence de l'anticorps primaire (20d9) dilué dans la solution de blocage 1 heure, lavées en PBS, et recouvertes de la solution de blocage contenant l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome Alexa-488. Les bactéries ont été lavées 5 fois en PBS. Les résultats étaient lus à 460 nm avec un lecteur de plaques 1420 Multilabel Counter VICTOR (Perkin Elmer). Les barres d'erreur (écart type) ont été établies sur au moins trois expériences indépendantes.

Purification de Pili

Des bactéries ont été resuspendues en éthanolamine 0,15M, pH 10,5, favorable à la dissociation des fibres de Pt4. La suspension est vortexée 1 minute pour casser les fibres. Les corps bactériens ont été éliminés par centrifugation à 17000g, pendant 30 minutes à 4°C. Les Pt4 étaient précipités avec du sulfate d'ammonium à saturation dilué au 1/10 pendant 1 heure à température ambiante, puis centrifugés à 17000g pendant 30 minutes. Le culot a été lavé en Tris 50mM pH 7,5 puis resuspendu dans du tampon Laemmli.

Production et purification des protéines fusionnées à la MBP

La construction MBP-PilX, décrite dans (Helaine *et al.*, 2007), nous a été gracieusement fournie par V. Pelicic. Pour les trois pilines PilE, PilV et ComP, nous avons suivi le même protocole que celui décrit pour PilX (Helaine *et al.*, 2007). Les amorces utilisées sont décrites dans le Tableau 1. Les protéines ont été couplées à des billes Polybeads® carboxylates (polyscience inc.) en suivant les recommandations du fournisseur.

Statistiques

Les statistiques ont été établies sur un minimum de trois expériences indépendantes. Pour les fréquences de recrutement, chaque expérience correspond à la fréquence de recrutement de 40 colonies en moyenne. Les figures présentées correspondent à la moyenne de ces fréquences. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type de ces moyennes. Un test de Student sur la distribution des valeurs de fréquences a été pratiqué et présenté lorsqu'il est significatif. Pour le recrutement sous les billes Polybeads® couplées aux protéines recombinantes, un test t a été pratiqué et le résultat présenté.

Tableau 1 :

Région disulfure de PilV	
PilV (PacI)	TTAATTAAAGGAGTAATTTTATGAAAAACGTTCAAAAAGGC
PilV (PmeI)	GTTTAAACTTAGTCGAAGCCGGGGCAG
PilV (BaeI)F	CGGCGAAACCTGCGTCGACATCTACTATAGTATCTCCCGGGTGCC CCGGCTTCG
PilV (BaeI)R	CGAAGCCGGGGCACCCGGGAGATACTATAGTAGATGTGCGACGCA GGTTTCGCCC
PilV(ComP)F	AAGAAGTCCGCCAGTTCGTGTAGTGACGGGGCTGGATTATTTTAA GGAAATGATAAGGACTGCCC
PilV(ComP)R	GTCCTTATCATTTTCCTTTAAATAATCCAGCCCGTCACTACACGAAC TGGCGGACTTCTT G CAGG
PilV(Flag)F	GTCGACTACAAAGATGACGATGACAAAGATTATAAGGACGATGAC GATAAGTCCCTGCCC
PilV(Flag)R	GGACTTATCGTCATCGTCCTTATAATCTTTGTCATCGTCATCTTTGT AGTCGACGAGG
Protéines MBP-pilines	
pilEp2XF (EcoR1)	GAATTCGCCCCGCGCACAAGTTTCC
pilEp2XR (Pst1)	CTGCAGTTAGCTGGCAGATGAATCATCG
pilVp2XF (EcoR1)	GAATTCGCGCGCGTCCGCCTGTCCG
pilVp2XR (Pst1)	CTGCAGTTAGTCGAAGCCGGGGCAGG
comPp2XF (EcoR1)	GAATTCGAGAAAGCAAAGATAAATGC
comPp2XR (Pst1)	CTGCAGCTACTTAAATAACTTGCAGTCC
pilEp2XR2 (Sal1)	GTCGACTTAGCTGGCAGATGAATCATCG
pilVp2XR2 (Sal1)	GTCGACTTAGTCGAAGCCGGGGCAGG
comPp2XR2 (Sal1)	GTCGACCTACTTAAATAACTTGCAGTCC

V. RESULTATS ANNEXES

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'occasion de participer à deux autres projets de recherche en relation avec mon sujet principal : (1) la caractérisation systématique des modifications post-traductionnelles de la piline dans notre souche d'étude et rôle de ces modifications sur l'interaction entre le méningocoque et son environnement, (2) l'étude des conséquences de la réorganisation du cytosquelette d'actine induite par le méningocoque sur le franchissement de la barrière hémato-encéphalique (BHE).

La piline, sous-unité majeure des Pt4, est une protéine essentielle à la biogenèse des Pt4. Elle joue un rôle structural central puisqu'elle seule semble capable de s'assembler pour former un pilus chez *N. meningitidis*. Mais cette protéine joue également un rôle dans les différentes fonctions associées aux Pt4. Ses propriétés biochimiques, en particulier les acides aminés exposés à la surface du pilus, influencent directement la capacité des Pt4 à former des bundles et donc la capacité des bactéries à agréger entre-elles (Marceau *et al.*, 1995; Nassif *et al.*, 1993). Certains variants de piline exhibent des capacités variables à adhérer aux cellules hôtes (Lambden *et al.*, 1980; Nassif *et al.*, 1993 ; Nassif *et al.*, 1994). Une modification post-traductionnelle de la piline, une phosphorylation, pourrait également être impliquée dans la compétence naturelle de *N. gonorrhoeae* (Aas *et al.*, 2006; Snyder *et al.*, 2001). Le variant de piline, ainsi que les modifications post-traductionnelles de cette protéine, exprimé par une souche peuvent donc avoir une influence significative sur certains aspects de la vie du méningocoque. En particulier, cela peut influencer sa capacité à coloniser sa niche écologique.

Une certaine confusion existe dans l'étude des modifications post-traductionnelles de la piline chez le méningocoque et le gonocoque. En effet, plusieurs études contradictoires décrivent ces modifications chez ces deux bactéries. La sérine en position 63 (S63) est glycosylée par un di-saccharide ou un tri-saccharide et la sérine en position 69 (S69) est décorée par un résidu phosphate ou phosphorylcholine ou phosphoethanolamine (Forest *et al.*, 1999; Hegge *et al.*, 2004; Power *et al.*, 2003; Stimson *et al.*, 1995; Warren and Jennings, 2003). Enfin, le résidu sérine en position 93 (S93) est parfois modifié avec un phosphoglycérol (Stimson *et al.*, 1996). Ces divergences ont été attribuées, dans un premier temps, aux imprécisions des techniques utilisées, puis finalement, à la diversité naturelle entre les souches ou les espèces étudiées, bien que la plupart de ces modifications soient attribuées de manière indistincte au gonocoque ou au méningocoque. Nous nous sommes intéressés aux modifications que subit la piline dans notre souche d'étude, un clone issu de la souche 8013 (2C43) exprimant le variant SB de la piline (Nassif *et al.*, 1993).

A. Une glycosylation alternative décore la piline de *N. meningitidis*

Ce premier travail a fait l'objet d'une publication scientifique présentée dans la suite. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la glycosylation présente sur le résidu S63. Une approche utilisant la spectrométrie de masse sur la protéine PilE entière (Top-down), a révélé que la masse totale de la piline ne correspondait pas à celle attendue en prenant en considérant les modifications décrites dans la littérature (Figure article 1). Une analyse plus fine par spectrométrie FT-ICR (*Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*) a permis de déterminer que la piline de notre souche n'était pas modifiée avec un tri-saccharide Gal-(β 1-4)-GlcNAc-(α 1-3)-DATDH (diacétamido-2,4,6-tridéoxyhexose) mais par un variant de ce sucre Gal-(β 1-4)-GlcNAc-(α 1-3)-GATDH (2,4-glycérarnidoacétamido-2,4,5-tridéoxyhexose) (Figures article 2 et 3). Une analyse *in silico* montre que l'allèle du gène *pglB* responsable du transfert du DATDH est différent dans la souche 2C43, et dans plusieurs autres souches de *Neisseria*, de celui présent dans la souche qui a permis de déterminer la nature du DATDH. Ce gène *pglB*, code une protéine bifonctionnelle possédant deux domaines (C-terminal et N-terminal) distincts. Le domaine C-terminal de la protéine PglB est différent entre les deux allèles. L'allèle présent dans notre souche a été nommé *pglB2*. L'échange des domaines C-terminaux entre les deux allèles *pglB*, de la souche MS11 de *N. gonorrhoeae*, et *pglB2*, de la souche 2C43 de *N. Meningitidis*, suffit à remplacer le GATDH par un DATDH dans la souche 2C43 (Figure article 4). Les allèles *pglB* et *pglB2* sont retrouvés indistinctement dans des souches de *N. meningitidis* ou *N. gonorrhoeae*. Ce travail montre que les modifications post-traductionnelles de la piline entre méningocoque et gonocoque peuvent être conservées. La différence de glycosylation entre les souches est codée génétiquement et génère une variabilité au sein des deux espèces.

Ma contribution à ce travail concerne 2 points particuliers. Nous avons observé que la glycosylation avait un effet sur le déclenchement de la réorganisation du cytosquelette d'actine. L'absence de cette glycosylation se traduit par une réduction de 50% de la fréquence de recrutement de l'ezrine. J'ai donc participé à l'étude du rôle de cette glycosylation dans l'interaction avec la cellule hôte. Ce travail est à l'origine de l'étude du rôle des Pt4 dans la réorganisation du cytosquelette d'actine. De plus, j'ai participé à la caractérisation du

comportement biochimique de la piline en fonction de la présence du sucre, notamment en utilisant la technique de la migration des protéines sur gel bidimensionnel. Ces résultats initiaux nous ont alors conduits à l'analyse par spectrométrie de masse.

Nous n'avons pas déterminé comment la glycosylation influençait la réorganisation du cytosquelette d'actine. Cependant cet effet de la glycosylation de la piline n'est pas cumulatif avec celui du mutant n'exprimant pas PilV. Nous pensons donc, aujourd'hui, que cette glycosylation affecte les propriétés biochimiques globales des pili, ce qui pourrait suffire à moduler la transduction du signal vers la cellule hôte.

Alternative *Neisseria* spp. type IV pilin glycosylation with a glyceramido acetamido trideoxyhexose residue

Julia Chamot-Rooke^{*†}, Benoit Rousseau^{*‡}, Fanny Lanternier^{*§}, Guillaumin Mikaty^{*§}, Emilie Mairey^{*§}, Christian Malosse^{*†}, Guy Bouchoux^{*†}, Vladimir Pelicic^{*§¶}, Luc Camoin^{§||**††}, Xavier Nassif^{*§‡‡}, and Guillaume Duménil^{*§,§§}

^{*}Ecole Polytechnique, Laboratoire des Mécanismes Réactionnels, Département de Chimie, F-91128 Palaiseau, France; [†]Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7651, F-91128 Paris, France; [‡]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 570, F-75015 Paris, France; [§]Université René Descartes, Faculté de Médecine René Descartes, F-75006 Paris, France; ^{||}Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 8104, F-75014 Paris, France; ^{**}Institut Cochin, Département de Biologie Cellulaire, F-75014 Paris, France; ^{††}Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 567, F-75014 Paris, France; and ^{‡‡}Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker–Enfants Malades, F-75015 Paris, France

Edited by Emil C. Gotschlich, The Rockefeller University, New York, NY, and approved July 24, 2007 (received for review June 8, 2007)

The importance of protein glycosylation in the interaction of pathogenic bacteria with their host is becoming increasingly clear. *Neisseria meningitidis*, the etiological agent of cerebrospinal meningitis, crosses cellular barriers after adhering to host cells through type IV pili. Pilin glycosylation genes (*pgl*) are responsible for the glycosylation of PilE, the major subunit of type IV pili, with the 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyhexose residue. Nearly half of the clinical isolates, however, display an insertion in the *pglBCD* operon, which is anticipated to lead to a different, unidentified glycosylation. Here the structure of pilin glycosylation was determined in such a strain by “top-down” MS approaches. MALDI-TOF, nanoelectrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance, and nanoelectrospray ionization quadrupole TOF MS analysis of purified pili preparations originating from *N. meningitidis* strains, either wild type or deficient for pilin glycosylation, revealed a glycan mass inconsistent with 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyhexose or any sugar in the databases. This unusual modification was determined by in-source dissociation of the sugar from the protein followed by tandem MS analysis with collision-induced fragmentation to be a hexose modified with a glyceramido and an acetamido group. We further show genetically that the nature of the sugar present on the pilin is determined by the carboxyl-terminal region of the *pglB* gene modified by the insertion in the *pglBCD* locus. We thus report a previously undiscovered monosaccharide involved in posttranslational modification of type IV pilin subunits by a MS-based approach and determine the molecular basis of its biosynthesis.

mass spectrometry | *pglB* | Pili

In eukaryotes, glycosylation is recognized as a key feature of surface proteins involved in particular in cell–cell and cell–matrix recognition. Recently, an increasing number of reports describe O- and N-glycosylation of surface bacterial proteins, in particular in mucosa-associated pathogens (1). The importance of these glycosylation events in host colonization and pathogenesis is becoming increasingly clear.

The Gram-negative bacterium *Neisseria meningitidis* is a commensal of the human nasopharynx: 10–20% of the human population are carriers (2). *N. meningitidis* is, however, better known as the etiologic agent of cerebrospinal meningitis. At a low frequency, the bacteria cross the epithelial barrier and access the bloodstream where they rapidly proliferate, causing septicemia. In the bloodstream, *N. meningitidis* interacts with endothelial cells, crosses the blood–brain barrier, and proliferates in the brain.

Bacterial adhesion is a crucial step to colonize the nasopharynx and is thought to be a prerequisite for crossing the epithelium, accessing the blood, and crossing the blood–brain barrier (3, 4). Like numerous pathogens such as enteropathogenic *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, or *Pseudomonas aeruginosa*, pathogenic *Neisseria* harbor type IV pili that allow efficient colonization of the human mucosa (5). Although 15 proteins are involved in type IV pili biogenesis in *N. meningitidis* (6), the main component of this filamentous organelle is the pilin protein encoded by the *pilE* gene.

PilE undergoes several posttranslational modifications including glycosylation, although the role of these modifications remains unclear. Pilin glycosylation in *Neisseria gonorrhoeae* MS11 strain was first described based on crystallographic data (7) as an O-linked disaccharidic glycosylation of serine-63. In the *N. meningitidis* C311 strain, a trisaccharide composed of Gal(β1–4) Gal(α1–3) 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyhexose (DATDH) was identified by using GC-MS (8). A similar structure was found on the pilin of the MS11-derived N400 strain by using MS approaches (9, 10) with a hexose linked to a DATDH.

The genes involved in pilin glycosylation, designated as *pgl* genes for pilin glycosylation, were initially identified based on sequence homology searches. The *pglA* gene was first identified (11), followed by the *pglBCD* cluster (12, 13). The individual function of *N. meningitidis* PglB, PglC, and PglD was proposed by Power *et al.* (12) based on sequence homologies of the *pgl* genes from the MC58 and C311 *N. meningitidis* strains, which present a DATDH on serine-63. Based on these predictions, these enzymes would synthesize UDP-DATDH from UDP-GlcNAc with steps of dehydration (PglD) on carbons 4 and 6, and an amino transfer (PglC) and acetylation (PglB) on carbon 4. Homologs of the *pglBCD* genes can be found in *Campylobacter jejuni*, which synthesizes 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyglucopyranose as part of an oligosaccharide present on several proteins (14–16). The individual function of the proteins encoded by the *C. jejuni* *pgl* genes has been characterized at the biochemical level, and these results confirm the predicted functions for the *pglBCD* genes in *N. meningitidis* (17, 18). PglB is a bifunctional enzyme, the carboxyl-terminal half (PglB_{Cter}) has the acetylation activity described above, and the amino-terminal half transfers the activated DATDH to a lipid carrier. Galactose residues are added to DATDH by *pglA* and *pglE* (19). The glycolipid would be transported to the periplasmic side of the inner membrane by PglF, and, finally, PglL would transfer the oligosaccharide to PilE (20).

Importantly, Kahler *et al.* (13) reported a variation on this theme; in their *N. meningitidis* strain (NMB), an insertion was found in the *pglB* gene. As a consequence, the carboxyl-terminal part of PglB does not present any homology to acetyl transferases but rather with

Author contributions: J.C.-R. and G.D. designed research; J.C.-R., B.R., F.L., G.M., E.M., C.M., L.C., and G.D. performed research; V.P., L.C., and G.D. contributed new reagents/analytic tools; J.C.-R., G.B., L.C., X.N., and G.D. analyzed data; and J.C.-R., X.N., and G.D. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Abbreviations: DATDH, 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyhexose; GATDH, glyceramido acetamido trideoxyhexose; ISD, in-source dissociation; FT-ICR, Fourier transform ion cyclotron resonance; Q-TOF, quadrupole TOF; MS/MS, tandem MS.

[†]Present address: Department of Molecular Microbiology and Infection, Imperial College London, London SW7 2AZ, United Kingdom.

^{§§}To whom correspondence should be addressed. E-mail: dumenil@necker.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0705335104/DC1.

© 2007 by The National Academy of Sciences of the USA

B. Une modification post-traductionnelle de la piline de type IV induite au contact des cellules hôte favorise la colonisation de nouveaux sites par N. meningitidis

Les résultats résumés ici font l'objet d'un article scientifique en préparation. Dans cet article, présenté dans la suite, nous avons étudié les phosphorylations décrites sur la piline sur les sérines en position 69 (68 chez *N. gonorrhoeae*) et 93.

Nous avons utilisé la même approche de spectrométrie de masse que dans l'étude précédente (Top-down). Dans la souche 2C43, les S69 et S93 sont toutes deux décorées par un phosphoglycérol plutôt qu'une phosphorylcholine ou phosphoéthanolamine décrits chez *N. gonorrhoeae* (Figure article 1) (Hegge *et al.*, 2004; Warren and Jennings, 2003). Toutes les pilines sont modifiées ainsi sur S69 et 10% d'entre elles le sont également sur S93. Le gène *pptA* (ou *dca*) décrit comme codant l'enzyme responsable du transfert des résidus phosphoéthanolamine chez *N. gonorrhoeae* n'est pas responsable des phosphorylations observées chez 2C43 (Warren and Jennings, 2003). Un gène que nous appelons *pptB* présente des homologies de séquence avec des gènes codant des enzymes de transfert de phosphoglycérol chez d'autres bactéries (Figure article 1). L'expression de ce gène est nécessaire à la modification des deux sérines chez 2C43 (Figures article 1 et 2). De manière intéressante, le gène *pptB* appartient au groupe de 16 gènes présentant un promoteur CREN inducible au contact des cellules de l'hôte (Morelle *et al.*, 2003). Cela suggère un rôle possible pour ce gène, et donc pour la glycéro-phosphorylation de la piline, dans la colonisation de sa niche écologique par *N. meningitidis*. Nous avons vérifié que, après plusieurs heures de colonisation ou dans un système d'induction contrôlé, l'augmentation d'expression du gène *pptB* se traduisait par une augmentation de la phosphorylation de la piline. Dans ces conditions, 100% des protéines arborent les deux phosphoglycérols et une

sous-population présente un ou deux autres phosphoglycérol sur des sites non déterminés (Figure article 2). Cette augmentation de la quantité de résidus acides sur la surface des pili se traduit par une perte de la capacité des pili à former des bundles, et en conséquence, une perte de la capacité des bactéries à former des agrégats (Figure article 3). L'agrégation bactérienne est essentielle pour former et maintenir des microcolonies sur les cellules humaines. Il est donc possible que la sur-phosphorylation de la piline entraîne une perte de la capacité des bactéries à former des microcolonies. Après plusieurs heures de colonisation, les bactéries qui se divisent seraient emportées par la circulation de mucus ou de sang au lieu de se maintenir dans la microcolonie. Nous avons testé cette hypothèse et observé, en utilisant une chambre à flux laminaire, que la surexpression du gène *pptB* permettait à une proportion des bactéries de se décrocher des cellules après quelques heures d'infection (Figure article 4). Nous proposons donc un modèle dans lequel une modification post-traductionnelle de la piline participe à la colonisation des cellules eucaryotes par le méningocoque (Figure article 4). Un gène responsable du transfert d'un phosphoglycérol sur la piline est surexprimé lorsque la bactérie est au contact des cellules, cela se traduit par une augmentation du nombre de phosphoglycérol sur les pilines et par une acidification globale des pili. Ceux-ci sont alors incapables de former des bundles et les bactéries perdent leur capacité à agréger. Ce mécanisme permettrait un réensemencement de la muqueuse nasopharyngée depuis une colonie.

Dans cette étude, j'ai eu l'occasion de participer à deux étapes clefs. Tout d'abord, j'ai participé à la caractérisation biochimique des différentes souches. En particulier, l'étude de la migration de la piline en gel bidimensionnel a permis de montrer une acidification de cette protéine au cours du temps pendant l'infection. La surexpression, *in vitro*, du gène *pptB* se traduit par une acidification comparable de la piline. Cette étude suggère que l'induction de l'expression du gène *pptB* au contact des cellules hôte se traduit bien par une augmentation de la phosphorylation de la piline. J'ai ensuite participé à la caractérisation phénotypique des souches. J'ai notamment déterminé que, contrairement à la glycosylation, cette modification n'a aucun effet sur l'induction de la réorganisation du cytosquelette d'actine par les Pt4. En revanche, j'ai caractérisé, par une analyse quantitative, le défaut d'agrégation de la souche surexprimant le gène *pptB*. Cette caractérisation nous a permis d'attribuer une fonction à cette modification post-traductionnelle de la piline.

***Posttranslational modification of type IV pilin regulates
Neisseria meningitidis dissemination to new infection sites***

Julia Chamot-Rooke^{1,2}, Guillaïn Mikaty^{3,4}, Christian Malosse^{1,2}, Magali Soyer^{4,5}, Patricia Martin^{3,4}, Guilhem Clary^{4,6,7}, Philippe Chafey^{4,6,7}, Luc Camoin^{4,6,7}, Xavier Nassif^{3,4,8}, and Guillaume Duménil^{4,5,*}

¹ Laboratoire des Mécanismes Réactionnels, Département de Chimie, Ecole Polytechnique, Palaiseau, F-91128, France

² CNRS, Unité Mixte de Recherche 7651, Palaiseau, F-91128, France

³ INSERM, U570, Paris, F-75015 France

⁴ Université Paris Descartes, Faculté de Médecine Paris Descartes, Paris, France

⁵ INSERM, U970, Paris Cardiovascular Research Center, Paris, F-75015 France

⁶ CNRS, UMR 8104, Paris, F-75014, France

⁷ INSERM, U567, Paris, F-75014, France.

⁸ AP-HP, Hôpital Necker-enfants malades, Paris, F-75015, France

* Corresponding author; guillaume.dumenil@inserm.fr; Tel : 33 1 53 98 80 49

C. Les pili de type IV du méningocoque déclenchent le recrutement du complexe de polarité cellulaire permettant le franchissement de l'endothélium cérébral

Ces résultats ont été publiés sous la forme d'une lettre scientifique présentée dans la suite. Une question restée sans réponse à ce jour est le mode de franchissement de la BHE par le méningocoque. Deux hypothèses s'opposent : soit la bactérie franchit la barrière cellulaire par transcytose, soit elle passe entre les cellules après ouverture des jonctions serrées intercellulaires. Dans les deux cas, l'hypothèse suggère que la réorganisation du cytosquelette d'actine induite par *N. meningitidis* participe au franchissement. Soit, comme il a été suggéré, ce mécanisme moléculaire favorise l'internalisation des bactéries, soit le recrutement de protéines sous les colonies bactériennes déstabilise les jonctions intercellulaires et permet l'ouverture de ces jonctions et le franchissement de la barrière (Eugene *et al.*, 2002; Hoffmann *et al.*, 2001; Lambotin *et al.*, 2005).

Nous avons pu observer que, contrairement aux résultats obtenus avec des cellules épithéliales, les protéines des jonctions intercellulaires sont recrutées dans la plaque corticale si l'on l'infecte de cellules endothéliales cérébrales humaines (VE-cadhérine, p120, β -caténine, ZO1, ZO2 et Claudine5) (Figure article 1) (Pujol *et al.*, 1997). Suite à l'adhésion du méningocoque, l'activation de la petite GTPase Cdc42 induit le recrutement du complexe de polarité Par6/PKC ζ . Ce complexe permet le recrutement, d'une part de la p120 puis de la cortactine et donc le recrutement du complexe Arp2/3 qui nucléé alors l'actine (Figures article 1 et 2) ; d'autre part Par6/PKC ζ induit le recrutement de Par3 qui recrute alors la VE-cadhérine puis la β -caténine (Figures article 2 et 3). Il est à noter qu'il existe également des interactions entre ces protéines à différents niveaux comme par exemple l'interaction entre l'actine et la VE-cadhérine ou encore le recrutement de la VE-cadhérine par la p120 (Figure article 2). De manière intéressante, l'inhibition de la kinase Src, activée durant l'infection, et qui permet la phosphorylation de la cortactine, se traduit bien par une absence de recrutement

d'actine dans ce modèle (Hoffmann *et al.*, 2001). L'inhibition de cette voie de signalisation se traduit par une absence de polymérisation d'actine dans les plaques corticales mais ne modifie en rien le recrutement d'autres protéines comme l'eitrine. Cette voie de signalisation s'inscrit donc parfaitement dans les mécanismes déjà décrits de la réorganisation du cytosquelette d'actine induite par le méningocoque. Elle semble également être spécifique des cellules endothéliales.

Nous avons ensuite démontré que, dans un modèle *in vitro* de monocouche jointive de cellules endothéliales, le recrutement des protéines de jonction se traduit par une déstabilisation et parfois une ouverture des jonctions serrées. Cela crée des « trous » entre les cellules par lesquels le méningocoque peut alors traverser la monocouche de cellules (Figure article 4). Ce passage est dépendant de la présence de Pt4 et du recrutement des protéines de jonction. Ces travaux nous ont permis de démontrer pour la première fois que dans un modèle *in vitro* le méningocoque induit une réorganisation des jonctions intercellulaires, ce qui permet l'ouverture des jonctions et le passage des bactéries à travers une barrière de cellules endothéliales.

Mon implication dans cette étude a consisté à caractériser les facteurs bactériens déclenchant la réorganisation du cytosquelette d'actine. Mon travail a permis de démontrer que les Pt4 sont essentiels au recrutement de la plaque corticale dans son entier. Cela a notamment permis d'étudier le recrutement des protéines des jonctions serrées. De plus, les souches Caps-Opa⁺ ont également offert des possibilités techniques, jusqu'alors inexistantes, qui ont contribué à la possibilité de mener à bien cette étude.

existed long enough for density-dependent mortalities to halt further growth, observed peak densities correlate closely with estimated site carrying capacities per square meter (Fig. 4B): The fact that site values vary by two orders of magnitude is due to differences in the ratio of *M. sabuleti* to other ants, *Myrmica* nest densities, and worker biomass. Because of the parameterization of stabilizing density-dependent larval mortalities within *Myrmica* nests (Eq. 2), model predictions of butterfly numbers 10 to 20 years ahead were as close to observed numbers as in the first decade (fig. S8). On more recently restored UK sites, the direction and size of annual *M. arion* population change was also close to model predictions (Fig. 4C).

M. arion's UK re-establishment is too recent for settled landscape-scale dynamics to emerge. During its natural colonization of 23 Polden Hills' sites, *M. arion* spread by stepping-stone occupation of neighboring habitat patches, taking 14 years to reach the furthest one, 4.4 km from a source introduction. The rate of increase of colonization distance from original sources was 1.9 times greater during years 8 to 14 than in years 0 to 4 ($P < 0.02$), possibly reflecting selection for dispersive adults consistent with shifts in thorax widths measured in UK *M. arion* populations during previous range changes (25). Seven sites experienced temporary occupancy in 2003 to 2008 (Fig. 2A): All were smaller than other conservation areas (average of 0.11 and 1.55 ha, respectively, and Mann-Whitney $P = 0.008$) and are regarded as ephemeral satellites of neighboring populations.

Surveys of *M. arion* across Europe have revealed similar declines for similar reasons (SOM). Today, successful but smaller-scale management is being applied in other nations on the basis of UK results, and *M. arion*'s global listing has changed from "vulnerable" to "near-threatened" (26). It will shortly downgrade from "endangered" to "vulnerable" in Europe and is one of just three UK butterflies due to meet the Convention of Biological Diversity's target to reverse species' declines by 2010 (27). The others inhabit similar-structured grassland: Their successful conservation derived directly from extensions of this research (7).

The *Maculinea* project tackled problems typical of many temperate butterflies that were disappearing from apparently suitable sites (7, 8) and provided insights for quicker, cheaper approaches. Having recognized that immature stages (and ant nest sites) typically exploit a narrow subset of their named resource and that the availability of optimum larval habitat alongside adult metapopulation constraints largely determines population sizes and persistence (7, 28), successful conservation was achieved across the genus *Maculinea*. Similarly, the declines of several phytophagous Palaearctic butterflies were reversed by identifying the subsets of food plants preferred by larvae, then perturbing ecosystems to generate them (7). Despite

these short-cuts, species-conservation is impractical for the vast majority of insects, for which the preservation of primary ecosystems or a community approach are appropriate (1). However, because many other threatened species increased on UK sites following targeted management for *M. arion* (29), we consider that successful species-based and community conservation for insects represent different routes to the same end.

References and Notes

- A. J. A. Stewart, T. R. New, O. T. Lewis, *Insect Conservation Biology* (CABI, Wallingford, UK, 2007).
- J. A. Thomas et al., *Science* **303**, 1879 (2004).
- J. A. Thomas, R. T. Clarke, *Science* **305**, 1563 (2004).
- A. Kosiorek, *Oryx* **41**, 79 (2007).
- K. F. Conrad et al., *Biol. Conserv.* **132**, 279 (2006).
- A. Erhardt, *J. Appl. Ecol.* **22**, 849 (1985).
- J. A. Thomas, in *The Scientific Management of Temperate Communities for Conservation*, I. Spellerberg, B. Goldsmith, M. G. Morris, Eds. (Blackwells, Oxford, 1991), pp. 149–197.
- T. R. New et al., *Annu. Rev. Entomol.* **40**, 57 (1995).
- J. A. Thomas, J. Settele, *Nature* **432**, 283 (2004).
- S. M. Wells, R. M. Pyle, N. M. Collins, *The IUCN Invertebrate Red Data Book* (International Union for Conservation of Nature, Gland, Switzerland, 1983).
- G. M. Spooner, *Entomology* **96**, 199 (1963).
- J. A. Thomas, *Oryx* **15**, 243 (1980).
- Materials and methods, as well as additional information, are available as supporting material on Science Online.
- K. Schönrogge et al., *Ecol. Lett.* **9**, 1032 (2006).
- J. A. Thomas, G. W. Elmes, *Proc. R. Soc. London Ser. B. Biol. Sci.* **268**, 471 (2001).
- N. Mouquet et al., *Ecol. Monogr.* **75**, 525 (2005).
- J. A. Thomas, *Oecologia* **132**, 531 (2002).
- J. A. Thomas, G. W. Elmes, J. C. Wardlaw, M. Woyciechowski, *Oecologia* **79**, 452 (1989).
- J. A. Thomas, J. C. Wardlaw, *Oecologia* **85**, 87 (1990).
- J. A. Thomas, J. C. Wardlaw, *Oecologia* **91**, 101 (1992).
- R. T. Clarke et al., in *Studies in the Ecology and Conservation of Butterflies in Europe 2*, J. Settele, E. Kuehn, J. A. Thomas, Eds. (Pensoft, Sofia, Bulgaria, 2005), pp. 115–119.
- G. W. Elmes, J. C. Wardlaw, K. Schönrogge, J. A. Thomas, *Entomol. Exp. Appl.* **110**, 53 (2004).
- G. W. Elmes et al., *J. Insect Conserv.* **2**, 67 (1998).
- Z. G. Davies, R. J. Wilson, S. Coles, C. D. Thomas, *J. Anim. Ecol.* **75**, 247 (2006).
- J. P. Dempster, in *The Conservation of Insects and Their Habitats*, N. M. Collins, J. A. Thomas, Eds. (Academic, London, 1991), pp. 143–153.
- www.iucnredlist.org/search
- M. S. Warren, personal communication.
- P. R. Ehrlich, I. Hanski, *On the Wings of Checkerspots* (Oxford Univ. Press, New York, 2004).
- G. W. Elmes, J. A. Thomas, *Biodivers. Conserv.* **1**, 155 (1992).
- We thank R. M. May for comments, R. Lewington for Fig. 1 illustrations, and 140 others for contributions and assistance (see reference S16). Funding, experimental sites and other resources were generously provided by the European Union Macman and Biodiversa (CLIMIT) programs, Natural England, Centre for Ecology and Hydrology, the National Trust, the Somerset Wildlife Trust, Network Rail, J and F Clark Trust, Butterfly Conservation, Gloucester Wildlife Trust, Millfield School, Defra, the World Wildlife Fund, Sir Terence Conran, Holland and Barrett, Hydrex, ICI, and R. Mattoni.

Supporting Online Material

www.sciencemag.org/cgi/content/full/1175726/DC1

Materials and Methods

SOM Text

Figs. S1 to S8

Table S1

References and Notes

1 May 2009; accepted 20 May 2009

Published online 18 June 2009;

10.1126/science.1175726

Include this information when citing this paper.

Meningococcal Type IV Pili Recruit the Polarity Complex to Cross the Brain Endothelium

Mathieu Coureuil,^{1*} Guillaumin Mikaty,¹ Florence Miller,^{2,3} Hervé Lécuyer,^{1,4} Christine Bernard,¹ Sandrine Bourdoulous,^{2,3} Guillaume Duménil,^{1,†} René-Marc Mège,⁵ Babette B. Weksler,⁶ Ignacio A. Romero,⁷ Pierre-Olivier Couraud,^{2,3} Xavier Nassif^{1,4}

Type IV pili mediate the initial interaction of many bacterial pathogens with their host cells. In *Neisseria meningitidis*, the causative agent of cerebrospinal meningitis, type IV pili-mediated adhesion to brain endothelial cells is required for bacteria to cross the blood-brain barrier. Here, type IV pili-mediated adhesion of *N. meningitidis* to human brain endothelial cells was found to recruit the Par3/Par6/PKCζ polarity complex that plays a pivotal role in the establishment of eukaryotic cell polarity and the formation of intercellular junctions. This recruitment leads to the formation of ectopic intercellular junctional domains at the site of bacteria–host cell interaction and a subsequent depletion of junctional proteins at the cell–cell interface with opening of the intercellular junctions of the brain-endothelial interface.

Neisseria meningitidis is a commensal bacterium of the human nasopharynx that, after bloodstream invasion, crosses the blood-brain barrier (BBB) (1). Few pathogens have a tropism for the brain, indicating that *N. meningitidis* possess specific components

to interact with the BBB. Meningeal colonization by invasive capsulated *N. meningitidis* is the consequence of the bacterial adhesion onto brain endothelial cells (2, 3), which is followed by bacterial division onto the apical surface of the cells (movie S1). This process is

VI. DISCUSSION

Un modèle plus complet pour la colonisation

Au cours de ma thèse, nous nous sommes intéressés à l'interaction entre une bactérie, à la fois commensale et pathogène, et son hôte. Au cœur de cette interaction, nous nous sommes focalisés sur la colonisation des cellules de l'hôte par *N. meningitidis*. Cette étape, centrale dans le cycle commensal et dans la pathogenèse de cette bactérie, a bien évidemment été largement étudiée par le passé. Cependant deux aspects avaient été négligés dans la plupart de ces études :

En premier lieu, l'étude d'Emilie Mairey au laboratoire, a mis en évidence l'impact des forces hydrodynamiques sur ces étapes de colonisation (Mairey *et al.*, 2006). L'application de ce type de forces au cours de l'infection *in vitro*, peut enrichir les connaissances sur les différents mécanismes moléculaires impliqués et éventuellement nous permettre de découvrir des mécanismes encore inconnus. En second lieu, l'interaction entre une bactérie et une cellule eucaryote implique une participation de chacune des deux cellules. Les nombreuses études menées sur d'autres pathogènes ont mis en évidence l'importance de la participation de la cellule eucaryote dans la survie, l'internalisation ou la colonisation de certaines bactéries pathogènes. C'est donc en intégrant ces deux aspects que nous avons abordé la question de la colonisation de l'hôte par *N. meningitidis*.

Cette approche a effectivement permis d'améliorer notre compréhension de la colonisation de l'Homme par le méningocoque. Tout d'abord, nous avons montré que la colonisation de cellules par le méningocoque, comme pour les pathogènes UPEC ou *Staphylococcus aureus*, est adaptée aux conditions hydrodynamiques de son environnement naturel, dans ce cas, la muqueuse nasopharyngée.

La donnée essentielle que nous avons mise en évidence est que les agrégats bactériens en suspension sont fragiles et se désagrègent sous l'action de forces mécaniques importantes (Mikaty *et al.*, 2009). Ce résultat a deux implications : les agrégats bactériens en suspension n'existent que dans des conditions où ces forces mécaniques sont modérées et la résistance des microcolonies sur les cellules humaines nécessite une intervention extérieure.

La première implication de ce résultat concerne l'adhésion initiale. La transmission du méningocoque se fait, la plupart du temps, lors d'un éternuement ou d'une expectoration. Dans le sang, ce sont des flux importants qui vont véhiculer la bactérie. Dans les deux cas, les forces hydrodynamiques mises en jeu sont incompatibles avec la résistance des agrégats. Il est donc probable que seuls de petits agrégats ou des bactéries individuelles circulent et adhèrent aux cellules humaines. Les protocoles classiques d'infection de cellules par le méningocoque

ne prenaient pas en compte cette donnée. Les cellules eucaryotes sont, en général, infectées avec un bouillon de bactéries contenant des agrégats de toutes tailles. Il n'est donc pas impossible que cette méthodologie a, en partie, faussé notre compréhension des étapes précoces de la colonisation. Notamment, les cinétiques d'infection sont probablement erronées. Certaines études montrent que la transition vers l'adhésion intime, où les bactéries sont étalées sur toute la surface des cellules sans former d'agrégats, se produit après 8 heures d'infection (Pujol *et al.*, 1997). Dans la chambre à flux laminaire, 24 heures d'infection ne suffisent pas à observer cette transition (communication personnelle M. Coureuil). Cette nouvelle donnée pourrait donc permettre une meilleure compréhension des étapes précoces et/ou de la cinétique d'infection.

La seconde implication de la fragilité des microcolonies, concerne directement mon travail sur la réorganisation du cytosquelette d'actine. Emilie Mairey avait montré que le méningocoque établissait des liaisons de type « slip bonds » avec la membrane de la cellule hôte (Mairey *et al.*, 2006). L'établissement de ces liaisons est sensible aux forces mécaniques. Pourtant, une fois en place, ces liaisons sont robustes. Nous avons alors montré qu'une conséquence du remodelage de la membrane plasmique suite à la réorganisation du cytosquelette d'actine, est de renforcer la cohésion des microcolonies à la surface des cellules (Mikaty *et al.*, 2009). Ces projections membranaires permettent à un nombre plus important de bactéries, au sein de la microcolonie, d'établir des liaisons robustes avec la membrane plasmique. La microcolonie n'est donc pas simplement formée grâce aux propriétés agrégatives des bactéries, mais nécessite également le détournement du cytosquelette d'actine de la cellule hôte. Il s'agit de la première démonstration que la cellule eucaryote prend part à la formation des microcolonies de *N. meningitidis*. Il est possible que cette colonisation très localisée permette à la bactérie de se multiplier localement avant d'envahir sa niche écologique ou de disséminer vers un nouvel hôte. Cette étape dans la colonisation des cellules était jusqu'alors incomprise.

Dans son manuscrit de thèse, Sophie Helaine, qui a caractérisé PilX et ses fonctions, postulait d'un rôle de l'agrégation dans le réensemencement des bactéries après la colonisation (Helaine, 2006). Après la formation des microcolonies, la perte d'agrégation semble, effectivement, être une étape nécessaire pour le décrochage des bactéries. Ce décrochage permet alors la recolonisation d'un nouveau site. Certains auteurs proposent que la réduction de la quantité de pili associée à l'adhésion intime permet cette perte d'agrégation et donc le réensemencement (Pujol *et al.*, 1997). Le Dr S. Helaine envisageait quant à elle, une répression de l'expression de PilX après l'adhésion (Helaine, 2006).

Notre travail sur les modifications post-traductionnelles de la piline a démontré la justesse de l'hypothèse. L'agrégation bactérienne est fonction de la capacité des pili à interagir parallèlement en formant des bundles et anti-parallèlement grâce à la présence de PilX (Helaine *et al.*, 2005; Marceau *et al.*, 1995; Nassif *et al.*, 1993). Le postulat s'est avéré confirmé mais c'est un autre mécanisme moléculaire qui a été sélectionné (hasard ou nécessité?). Non pas la répression de l'expression de PilX mais la surexpression d'un gène, *pptB*, modifiant les propriétés physico-chimiques de la piline. La surexpression du gène au contact de la cellule hôte permet une augmentation du nombre de glycéro-phosphates sur la piline PilE. Cela augmente l'acidité globale des pili et entraîne une perte de leur capacité à former des bundles. Cela permet effectivement aux bactéries de se décrocher des microcolonies après quelques heures d'infection. Ce résultat démontre également que le réensemencement des bactéries peut se produire avant la transition vers l'adhésion intime.

Enfin, le travail effectué pendant ma thèse a, à nouveau, placé les Pt4 au centre des processus de la colonisation du méningocoque. Nous avons démontré que les Pt4 sont le vecteur moléculaire de l'induction de la réorganisation du cytosquelette d'actine de la cellule hôte. Cette réponse cellulaire est essentielle au maintien des microcolonies à la surface des cellules humaines, en particulier dans la circulation sanguine (Mikaty *et al.*, 2009). Nous avons montré que deux protéines, PilV et PilX, dans la structure de ces pili, sont responsables de cette fonction. Cette fonction est la première associée à la protéine PilV chez *N. meningitidis* et, est une nouvelle fonction de la protéine PilX. Même si le rôle de la protéine PilU reste obscur, nous avons montré que celle-ci participe à l'induction de la réorganisation du cytosquelette, donc également à cette étape de la colonisation. Cette protéine n'avait aucune fonction connue chez *N. meningitidis*. Enfin, une modification post-traductionnelle de la piline PilE, semble jouer un rôle essentiel dans le réensemencement des bactéries.

La dualité commensal/pathogène

Un aspect particulièrement intéressant chez le méningocoque est son double statut de commensal et de pathogène. Le cas du méningocoque est original puisque, contrairement aux pathogènes dits « opportunistes », cette bactérie déclenche régulièrement des méningites chez des individus en bonne santé, suggérant que certaines souches sont capables seules, d'accéder au système sanguin et sont très efficaces pour échapper aux défenses naturelles de l'organisme. Ces caractéristiques sont parmi celles de bactéries pathogènes « professionnels ».

Les différents attributs moléculaires de la bactérie ont été sélectionnés au cours de l'évolution pour permettre aux *Neisseria* de survivre dans leurs environnements naturels. Comme aucun mécanisme de transmission n'a été découvert à ce jour après le franchissement de la barrière nasopharyngée, il est probable qu'une fois entré dans le système sanguin, le méningocoque n'a comme avenir possible que d'être détruit par le système immunitaire ou de tuer son hôte. Le cycle infectieux serait donc une impasse évolutive pour la bactérie (Taha *et al.*, 2002). Le corollaire est que aucun outil moléculaire n'a pu être sélectionné au cours de l'évolution spécifiquement pour ses caractéristiques dans la pathogenèse de la bactérie. Il est même possible que de tels outils soient contre-sélectionnés. Il est donc probable que, soit les outils moléculaires responsables de la pathologie ont été sélectionnés pour la vie commensale du méningocoque, soit leur présence n'est que peu délétère voire neutre pour la bactérie (Darwin, 1872; Kimura, 1983).

Notre travail s'inscrit entièrement dans l'hypothèse selon laquelle la pathogenèse serait une impasse évolutive pour la bactérie : l'adaptation du méningocoque à son environnement a des conséquences secondaires qui expliquent le développement particulier de la pathologie. Emilie Mairey a montré que l'adhésion du méningocoque aux cellules humaines ne peut se faire qu'à des flux très faibles, retrouvés dans le nasopharynx (Mairey *et al.*, 2006). Cette sensibilité aux forces mécaniques expliquerait, à elle seule, le tropisme particulier du méningocoque pour les capillaires, en particulier cérébraux. Cette localisation spécifique dans les capillaires sanguins est probablement à l'origine du *purpura fulminans* et de la méningite. De la même manière, nous avons montré que le remodelage de la membrane plasmique, qui permet aux bactéries de coloniser le nasopharynx, favorise l'ancrage des microcolonies le long de ces capillaires malgré des forces hydrodynamiques très importantes. La présence de ces microcolonies dans la circulation sanguine permet probablement la persistance des bactéries, et, sous l'action de *pptB*, leur diffusion permanente dans la circulation. L'autre conséquence de la présence des microcolonies le long des capillaires cérébraux est le recrutement des protéines de jonctions serrées. Ce recrutement induit une déstabilisation, puis une ouverture de ces jonctions (Coureuil *et al.*, 2009). Ce mécanisme est donc peut-être à l'origine du franchissement de la BHE et par conséquent de la méningite. Il pourrait également expliquer la nécrose des capillaires sanguins pendant le *purpura fulminans*. Un point intéressant dans cette dernière étude est la différence de réponse à l'adhésion des bactéries en fonction du type cellulaire considéré. Il a été montré que les protéines de jonctions serrées ne sont pas recrutées sous les microcolonies bactériennes infectant des cellules épithéliales (Pujol *et al.*, 1997). Il existe une différence à déterminer entre les voies de

signalisation activées par le méningocoque sur les cellules épithéliales et endothéliales. Cela signifie également que cette ouverture des jonctions cellulaires est une conséquence « imprévue » d'un mécanisme qui a été sélectionné dans un autre « but ».

Ces différents aspects de la colonisation du méningocoque sont donc adaptés aux conditions du nasopharynx, mais leur transposition dans la circulation sanguine a des effets favorisant le développement du *purpura fulminans* et de la méningite, symptômes spécifiques des infections à méningocoque.

Réponse cellulaire : nouveaux mécanismes et nouvelle fonction

Les modèles que sont *L. monocytogenes*, *S. flexneri* ou les EPEC, ont beaucoup influencé les études de la réorganisation du cytosquelette d'actine induite par les *Neisseria*. Cette influence est évidente, autant dans les voies de signalisation découvertes, que sur la fonction proposée pour cette réponse cellulaire. Notre travail montre à la fois, l'intérêt d'une telle influence, mais également ses limites.

Dans un premier temps, ces modèles ouvrent de nouvelles voies de recherche. La mise en évidence du rôle des « radeaux lipidiques » dans la réorganisation du cytosquelette d'actine induit par d'autres pathogènes a suggéré un rôle possible de ces structures dans le cas de *N. meningitidis*. Nous avons pu montrer un recrutement important du cholestérol ainsi que le rôle clef que celui-ci joue dans la mise en place de la plaque corticale. Ce rôle clef nous a fourni, pour la première fois, des outils pour bloquer la réponse cellulaire à ce niveau. De plus, il est aujourd'hui possible de proposer un rôle des « radeaux lipidiques » dans les voies de signalisation activées par le méningocoque. Une implication de ces microdomaines lipidiques aurait comme avantage d'expliquer le recrutement massif de nombreux récepteurs et l'activation de voies de signalisation comme celle de ErbB2. Ces différents récepteurs seraient recrutés à cause de leur localisation dans les « radeaux lipidiques ». Il reste alors à découvrir par quels mécanismes ces « radeaux lipidiques » sont recrutés.

Nos travaux sur PilV permettront peut-être de découvrir comment la plaque corticale est recrutée sous les microcolonies. L'analogie avec des protéines comme les Internalines de *Listeria* autorise l'hypothèse que PilV et PilX agissent directement sur un récepteur cellulaire. D'une part, les résultats obtenus par Anne-Flore Imhaus pendant son stage de Master, démontrent que PilV est, comme PilX, exposée à l'extérieur de la bactérie (Helaine *et al.*, 2007). D'autre part les résultats préliminaires obtenus avec la protéine MBP-PilV suggèrent

que PilV est effectivement capable d'agir directement sur la membrane plasmique. Nous avons notamment observé que des billes recouvertes de MBP-PilV recrutent aussi bien l'eitrine et l'actine que le cholestérol. La protéine PilV est peut-être la clef du recrutement de la plaque corticale.

Cependant, c'est en sortant du cadre de référence de ces pathogènes modèles, que Mathieu Coureuil a pu montrer le recrutement du complexe de polarité membranaire et les voies de signalisation qui en découlent (Coureuil *et al.*, 2009). Cette étude est, à ce jour, l'une des plus prolifiques dans la compréhension des mécanismes moléculaires cellulaires de la réorganisation du cytosquelette d'actine induite par le méningocoque.

Pourtant, ces modèles ont également ralenti, ou détourné, l'étude de la fonction de cette réponse cellulaire. C'est par analogie aux autres bactéries pathogènes qu'un rôle dans l'internalisation du méningocoque a été attribué à la réorganisation du cytosquelette. Il est effectivement possible que l'internalisation d'une sous population soit une conséquence de ce phénomène. Mais cela n'aurait probablement que peu ou pas de conséquences au niveau évolutif. L'internalisation d'une petite proportion de la population, qu'elle soit avantageuse ou non, n'expliquerait pas, à elle seule, la sélection de ce phénomène très efficace. En revanche, le rôle que nous proposons au remodelage de la membrane plasmique est une étape essentielle dans la colonisation. Cette étape serait donc soumise à une sélection forte.

Ces différents travaux ont apporté de nouvelles informations sur les molécules bactériennes impliquées dans le déclenchement des voies de signalisation mais également sur les voies de signalisation en question. Les protéines PilV et PilX ouvrent de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes moléculaires. Notamment, il sera peut-être possible dans un futur « proche » de déterminer comment ces protéines agissent. Et si elles agissent au travers de récepteurs cellulaires, quels sont ces récepteurs et quelles sont les voies de signalisation qui en découlent.

Mode d'action des pilines

Au travers des nombreux travaux sur les Pt4 du méningocoque, il apparaît que ce sont des outils moléculaires multifonctionnels étonnants. Ils sont essentiels à la vie commensale de la bactérie et leur rôle dans la pathogenèse n'est plus à démontrer. Cependant, de nombreux mécanismes moléculaires de leur fonctionnement restent obscurs. Ces organelles semblent dédiées à l'interaction de la bactérie avec son environnement. Les Pt4 supportent plusieurs

fonctions : l'adhésion, l'agrégation bactérienne, la compétence naturelle pour la transformation, la transduction de signaux cellulaires ou encore la motilité de la bactérie. A l'exception de la motilité, assurée, en grande partie, par la rétraction des pili, chaque fonction est portée à la fois par la piline PilE et par une autre protéine du système de piliation : PilC1 pour l'adhésion, PilX pour l'agrégation, ComP pour la compétence, enfin comme nous l'avons montré PilV et PilX pour le déclenchement de la réorganisation du cytosquelette d'actine (Helaine *et al.*, 2005; Helaine *et al.*, 2007; Marceau *et al.*, 1995; Nassif *et al.*, 1993; Nassif *et al.*, 1994; Wolfgang *et al.*, 1999). A l'exception de PilC1, ces protéines sont des pilines intégrées à la fibre. Comment ces protéines jouent-elles leur rôle ?

Comme le modèle suggère qu'elles sont toutes assemblées dans la fibre, les régions exposées sont restreintes. Le modèle de L. Craig et coll. montre que les régions $\alpha\beta$ ainsi que de la région disulfure hypervariable sont les principales régions exposées pour les protéines PilE et PilX (Craig *et al.*, 2006; Helaine *et al.*, 2007). Selon ce modèle, il est donc possible de postuler que ces régions seront exposées de la même manière pour PilV et ComP. Nous avons effectivement pu montrer par détection directe que la région disulfure de la protéine PilV est accessible, à l'extérieur de la bactérie, dans une structure ressemblant aux Pt4.

Deux hypothèses sont alors envisageables sur le mode de fonctionnement de ces protéines : les pilines mineures joueraient leurs rôles directement ou indirectement. Dans le premier cas, ComP lierait l'ADN ou peut-être plus spécifiquement les séquences DUS, PilX agirait dans l'agrégation en « accrochant » les protéines PilX des pili antiparallèles et PilV et PilX seraient des ligands de récepteurs cellulaires. Alternativement, les propriétés biochimiques de surface des pili seraient responsables de ces différentes fonctions, notamment les charges ou régions hydrophobes exposées. Chaque piline mineure pourrait localement modifier la surface du pilus assurant ainsi une fonction particulière. Dans les deux cas, PilE qui assure la structure du pilus, serait la principale responsable des propriétés de surface. Soit elle agirait en modulant les fonctions assurées par les pilines mineures, soit elle agirait directement et les pilines mineures modulerait ses fonctions.

A l'heure actuelle il est considéré que PilX agit directement sur l'agrégation alors qu'une liaison entre ComP et l'ADN n'a pas été clairement observée. De même, nos résultats exploratoires sur PilV suggèrent un rôle de ligand pour cette protéine mais excluent également que PilX puisse jouer ce rôle seule ou directement. Le fait qu'une phosphorylation de la piline puisse empêcher l'agrégation bactérienne est la démonstration du rôle direct de la piline dans cette fonction. Cependant, la variation antigénique de la piline est responsable d'un changement fréquent et important de séquence de la protéine PilE. A l'exception de

l'agrégation, cette variation antigénique ne modifie pas de façon drastique les fonctions associées aux Pt4 (Marceau *et al.*, 1995; Nassif *et al.*, 1993). PilE ne semble donc pas impliqué directement dans les autres fonctions associées aux Pt4.

Dans tous les cas, il semble que la région disulfure exposée à la surface du pilus est régulièrement impliquée dans les fonctions associées aux Pt4. Cela a été montré en particulier pour PilX dans l'agrégation, nous l'avons montré ici pour PilV et PilX et leur rôle dans le déclenchement de la réponse cellulaire. Si ces protéines agissent directement, alors il est possible que cette région soit le domaine de liaison aux ligands, sinon, les acides aminés exposés sont peut-être essentiels dans les propriétés biochimiques locales du pilus.

Un point m'a intrigué dans la structure de la région disulfure des pilines. Cette région disulfure est peu structurée dans les pilines PilE et PilX. Depuis les premières études de structure des protéines, un dogme est apparu selon lequel la structure fait la fonction. Ainsi, ce sont les régions structurées qui permettent à une protéine d'être fonctionnelle. Ce dogme est remis en question depuis quelques années puisqu'une famille de protéines non structurées ou à domaines non structurés, appelée IUP (*Intrinsically Unstructured Protein*) a été décrite chez les eucaryotes. Ces domaines non structurés sont définis par des régions dépourvues de structures secondaires et tertiaires stables en conditions physiologiques. La liaison à un ligand induit parfois une structure secondaire stable. Ces protéines ou domaines non structurés supportent des fonctions variées et cette absence de structure semble parfois permettre une multitude de fonctions ; ces protéines sont souvent impliquées dans des interactions directes avec d'autres molécules (Erales *et al.*, 2008; Erales *et al.*, 2009a; Erales *et al.*, 2009b). A ce jour, plus de 1000 protéines IUPs ont été référencées, pourtant ces protéines ont été peu décrites chez les procaryotes.

Pour le variant de piline PilE dont on connaît la structure, seules deux régions courtes de 4 acides aminés (soit 8 sur 30), forment une structure secondaire de deux feuillets β . Dans la région disulfure de PilX, une courte séquence de 6 acides aminés sur 18 forme une hélice α . Pour PilX, il a été montré que la région « non structurée » participe à la fonction agrégative associée à la protéine (Helaine *et al.*, 2007). Cette protéine pourrait donc être parmi les premières IUPs décrites chez les procaryotes. Cependant, nos résultats contredisent partiellement cette hypothèse puisque c'est justement la courte hélice α qui est essentielle à la fonction de PilX dans la réorganisation du cytosquelette eucaryote. Le point intéressant est que, si les pilines sont des IUPs, alors cela permettrait de progresser dans la compréhension de leurs modes d'action. Cela pourrait notamment expliquer la multifonctionnalité de PilE ou de

PilX, ou encore la possible capacité de PilV à lier un récepteur eucaryote, puisque ces caractéristiques sont communes chez les IUPs.

Rétraction des Pili de type IV et réorganisation du cytosquelette : Rôle de PilT

Avant de discuter du rôle de la rétraction des pili dans la transduction de signaux cellulaires, je souhaite faire un aparté sur les mécanismes moléculaires de cette rétraction.

Il existe un paradoxe dans les résultats décrivant la vitesse de rétraction des Pt4. D'un coté, certaines estimations avancent que PilT permet la rétraction de 1500 unités de piline par seconde (Burrows, 2005). D'un autre coté, les travaux sur l'homologue de PilT chez *Aquifex aeolicus* suggèrent une activité spécifique extrêmement faible de 15.7 nmol d'ATP hydrolysé/min/mg (Herdendorf *et al.*, 2002). Une estimation rapide rapporte qu'une molécule de PilT hydrolyse 10^{-2} molécules d'ATP par seconde. Cela est incompatible avec le modèle dans lequel l'hydrolyse d'une molécule d'ATP permet le retrait d'une piline (Crowther *et al.*, 2005; Herdendorf *et al.*, 2002; Satyshur *et al.*, 2007). D'après ces travaux réunis, l'hydrolyse d'une molécule d'ATP permettrait la rétraction de 25.000 pilines, soit environ 10 μ m de pilus (estimation sur la base du modèle proposé par (Craig *et al.*, 2006).

Ce paradoxe a été résolu en ce qui concerne l'assemblage du pilus. L'étude de l'orthologue de la protéine PilF, BfpD, dans les BFP de *E. coli* montre que la liaison de BfpD avec deux autres protéines du système (BfpE, orthologue de PilG et BfpC, sans orthologue connu dans les Pt4) augmente l'activité spécifique d'un facteur 1200 (Crowther *et al.*, 2005). Dans ce cas, et compte tenu des approximations, le modèle devient alors cohérent pour l'élongation du pilus. Notons au passage qu'un rôle équivalent de PilG, orthologue de BfpE, dans l'élongation du pilus expliquerait le rôle « anti-rétractant » attribué à cette protéine chez *N. meningitidis* (Carbonnelle *et al.*, 2006).

Dans le cas de la rétraction, aucun mutant découvert à ce jour ne présente de phénotype compatible avec une telle fonction dans la rétraction des Pt4. Il est cependant envisageable que le mécanisme de la rétraction soit différent de celui de l'élongation. Dans son essai sur la biologie, Erwin Schrödinger postule que l'organisation des molécules biologiques implique une lutte active contre les lois de l'entropie (Schrodinger, 1944). Ces lois de l'entropie suggèrent que la désorganisation est un état plus stable que l'organisation. De manière plus classique, comme l'élongation nécessite un apport important d'énergie, il n'est pas forcément nécessaire de consommer beaucoup d'énergie pour désassembler la fibre (Figure 38). La

liaison à l'ATP pourrait permettre un changement de conformation de l'hexamère de PilT suffisant pour déstabiliser la base du pilus alors que la liaison à l'ADP stabiliserait celle-ci. Lors de la liaison de PilT à l'ATP, le pilus (état d'entropie minimum de la piline) se désagrègerait par la base entraînant la fibre entière et la libération des pilines dans le périplasme (état d'entropie supérieur) sans dépenser plus d'énergie.

La rétraction des pili joue un rôle particulier dans les différentes fonctions de ceux-ci. Elle ne semble essentielle que pour la motilité et la compétence naturelle mais influence l'adhésion, l'agrégation et la transduction de certains signaux vers la cellule hôte. Le rôle de la rétraction dans la transduction de signaux vers la cellule hôte est complexe. Les travaux effectués sur *N. gonorrhoeae* suggèrent que la rétraction dépendant de PilT participe à la réorganisation du cytosquelette d'actine (Higashi *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2005b). L'absence de rétraction réduit la fréquence de recrutement du nid d'abeille, de plus celui-ci est mal structuré. En revanche, nos résultats sur *N. meningitidis* ne concordent pas sur tous ces aspects. D'une manière générale, l'effet de la rétraction sur la structure des nids d'abeille est souvent observable. Cependant dans notre première étude, l'absence de rétraction a un léger effet sur la fréquence de recrutement, mais pas dans la seconde (Mikaty *et al.*, 2009)(Chapitre III.B.). Des tests ont permis de montrer que cette différence n'est pas due au contexte génétique Caps-Opa⁺ mais aux cellules humaines. Les cellules Huvec utilisées dans les deux cas étaient issues de lots différents et répondaient différemment à ce mutant. Quoiqu'il en soit, il semble évident que la rétraction dépendant de PilT n'est pas impliquée dans le déclenchement de la réponse cellulaire.

La rétraction des pili génère des forces relativement importantes de l'ordre de 100 picoNewton par fibre et 1 nanoNewton par bundle (Biais *et al.*, 2008; Maier *et al.*, 2002). De telles forces, à elles seules, sont capables de déclencher des voies de signalisation par mécano-transduction. Cela a été décrit dans le cas de la régulation des gènes de la cellule hôte par le méningocoque (Howie *et al.*, 2005). D'un autre côté, les pili seuls sont capables de déclencher une voie de signalisation calcique en absence de rétraction (Kallstrom *et al.*, 1998).

Dans un modèle simple, on peut imaginer que les pili interagissent avec la cellule eucaryote par les deux voies. D'une part, la liaison directe, par exemple des pilines mineures, avec des récepteurs membranaires déclenche des voies de signalisation, d'autre part, la rétraction assurée par PilT déclenche des voies de signalisation parallèles par mécano-transduction. Ces deux signaux peuvent alors agir en synergie, comme il semble que ce soit le cas pour la

réorganisation du cytosquelette chez le gonocoque, ou par des voies indépendantes comme pour la signalisation calcique ou la modification d'expression des gènes de la cellule hôte.

Comment alors peut-on expliquer l'impact de la rétraction sur le phénotype des mutants de *pilV* et *pilX*? En effet, l'absence de rétraction, au lieu d'amplifier le phénotype comme on aurait pu le supposer *a priori*, le compense. Il existe deux explications simples à ce phénomène. Dans la première, la présence d'une quantité de pili 10 fois plus importante permet d'augmenter localement la quantité de protéine PilV ou PilX. L'augmentation de la quantité de l'une pourrait compenser l'absence de l'autre. Dans la seconde, l'absence de rétraction permet de stabiliser l'interaction entre PilV et son récepteur quand l'absence de PilX a l'effet inverse (et *vice versa*). Cette compensation l'emportant sur le défaut phénotypique lié à l'absence de rétraction.

Comme les phénotypes des mutants de *pilT* et *pilU* sont très similaires, une autre explication serait liée à une interaction complexe entre PilT et PilU. Cette hypothèse est discutée dans le paragraphe suivant.

Rétraction des Pili de type IV et réorganisation du cytosquelette : Rôle de PilU

Comment la protéine PilU influence-t-elle le recrutement de la plaque corticale? Cette protéine semble jouer un rôle de bride de la capacité du méningocoque à réorganiser la membrane plasmique de la cellule hôte. D'une part, les phénotypes observés en terme d'adhésion ou de transduction du signal suggèrent fortement que cette protéine est effectivement fonctionnelle chez les *Neisseria* (Park *et al.*, 2002). D'autre part, les homologies de séquence avec PilT ainsi que la fonction caractérisée de son orthologue chez *P. aeruginosa* forcent l'hypothèse que PilU participe à la rétraction des pili (Whitchurch and Mattick, 1994). Comment expliquer alors que cette fonctionnalité ne soit pas mesurable et comment PilU agit sur la transduction du signal?

En admettant que PilU est fonctionnelle et participe à la rétraction des pili de manière similaire à PilT, celle-ci peut agir soit en formant un homohexamère comme PilT, soit en formant un hétérohexamère avec PilT. Pour expliquer que l'activité de PilU n'est pas mesurable, soit PilT est capable de compenser l'absence de PilU, puisque la protéine est capable de former des hexamères seule *in vitro*, soit la participation de PilU à la rétraction ne concerne qu'une sous fraction des pili rendant la détection de cette activité difficile.

Dans les deux cas : pourquoi synthétiser une protéine dont la fonction est déjà assurée par une autre ? Simplement parce que, comme les phénotypes divergents des mutants de *pilT* et *pilU* le confirment, la fonction des deux moteurs moléculaires est différente. De plus, le fait que l'absence de PilU se traduise par un phénotype beaucoup plus fort (voire inverse), en terme de transduction du signal, suggère également que PilT n'est, en réalité, pas capable de compenser l'activité de PilU. En conséquence, selon ce postulat : PilT ne peut pas rétracter les pili de PilU.

Le corollaire de cette démonstration est donc qu'il existerait au moins deux types de Pt4 différents chez les *Neisseria*. Le premier type dont la rétraction est assurée par PilT et le second par PilU (Figure 39). A partir de ce postulat, il est possible de proposer une composition différente pour ces deux types de pili en fonction des différents phénotypes des mutants. Par exemple, un mutant n'exprimant plus PilU est toujours compétent pour la transformation mais pas un mutant de *pilT*, cela localise la piline mineure ComP dans les pili de PilT. Le mutant de PilU s'oppose à la transduction du signal assurée par PilV et PilX, si les deux protéines agissent directement sur un récepteur, alors on les retrouvera dans les pili de PilU. La participation de PilT à l'agrégation suggère que PilX pourrait également être localisée dans les pili de PilT.

Cette hypothèse expliquerait également certains résultats de plusieurs autres études. En particulier, les phénotypes des mutants des protéines classées dans la catégorie « stabilisation et/ou maturation fonctionnelle » par le groupe de V. Pelicic : PilG, PilC (PilC1/PilC2), PilH, PilI, PilJ et PilK. Les mutants n'exprimant pas ces différentes protéines n'ont plus de pili. Cela est compensable par une mutation au locus de PilT. Les pili des mutants *pilC/pilT*, *pilI/pilT*, *pilJ/pilT* et *pilK/pilT* ne sont ni adhérents, ni agrégatifs contrairement aux pili restaurés dans *pilG/pilT* et *pilH/pilT*. Nous avons testé la capacité de ces mutants à recruter l'eitrine et le résultat surprenant était qu'aucun de ces mutants, en particulier *pilG/pilT* et *pilH/pilT*, n'est capable de recruter la protéine (résultats non illustrés). Ce résultat s'expliquerait si l'introduction d'une mutation au locus de PilT ne restaure que les pili de PilT alors que les pili de PilU sont toujours rétractés. Les bactéries ne peuvent déclencher de réponse cellulaire, puisque cette fonction est portée par les pili de PilU. Le phénotype particulier des mutants *pilG/pilT* et *pilH/pilT* nous indique également que les pili de PilT permettent l'adhésion et l'agrégation alors que ceux de PilU sont signalisateurs.

Un dernier argument en faveur de cette hypothèse provient des travaux de H.C. Winther-Larsen et coll. sur les pilines du gonocoque. Ces travaux s'appuient sur le fait que les protéines PilV et PilX (PilL chez *N. gonorrhoeae*) co-purifient avec les pili. Cependant, dans

les doubles mutants déjà cités *pilC,H,I,J,K/pilT*, la protéine PilX ne co-purifie plus avec les fibres (Winther-Larsen *et al.*, 2005). En forçant l'expression de pili de PilT, on n'observe pas de protéine PilX dans ces pili. Bien qu'il existe d'autres explications, on peut imaginer que PilX est localisée dans les pili de PilU et non pas de PilT. La même observation avait été faite, sans être comprise, à propos de PilV absent des pili dans le mutant *pilC/pilT* (Winther-Larsen *et al.*, 2001).

Cette hypothèse ouvre donc de nombreuses perspectives sur la compréhension du fonctionnement des Pt4. Elle est, sans aucun doute, l'une de celles qui m'ont le plus convaincu sur le fonctionnement des Pt4. Cependant, elle reste difficile à démontrer formellement puisqu'une activité de rétraction de PilU n'a pas été mise en évidence.

A la lumière de cette hypothèse, il devient possible de proposer d'autres explications à la compensation du défaut de transduction du signal des mutants de *pilV/pilT* et *pilX/pilT*.

Si PilU rétracte des pili particuliers en formant un hétérohexamère avec PilT, alors en l'absence de PilT, PilU pourrait être incapable de rétracter des pili. Le phénotype des mutants *pilV/pilT* et *pilX/pilT* serait en réalité lié à l'absence de fonctionnalité de PilU et donc serait le phénotype des mutants *pilV/pilU* et *pilX/pilU*. Cependant, la fréquence de recrutement de la plaque corticale du mutant de *pilT* est plus faible que celle du mutant de *pilU* alors que l'on s'attendrait à observer la même fréquence de recrutement. Dans ce cas, il faut imaginer que la présence d'une grande quantité de pili de PilT à l'extérieur de la bactérie gêne l'interaction des pili de PilU avec la membrane de la cellule hôte.

Si PilU est capable d'assurer seule la rétraction des pili, un autre mode d'action est envisageable. Comme la quantification des Pt4 par ELISA le suggère, il semble que les pili de PilT sont beaucoup plus nombreux que ceux de PilU. Le mutant de *pilT* arbore 1000% de pili alors que celui de *pilU* exprime 120% (+/-30) par rapport à la souche parentale. Il est possible que l'absence de rétraction de la majorité des pili stabilise les autres à l'extérieur, soit par un effet de nombre, soit parce que les deux types de pili forment des bundles hétérogènes. La compensation du défaut de recrutement observée dans les mutants de *pilT* serait, là encore, liée à une mauvaise rétraction des pili de PilU et non pas de ceux de PilT.

Comment PilV et PilX agissent-elles sur la réorganisation du cytosquelette ?

Pour comprendre les différentes hypothèses sur le mode de fonctionnement de ces deux pilines, il fallait poser au préalable les modèles de fonctionnement des Pt4. Je finirai donc ce mémoire par la question centrale qui m'a occupé pendant ma thèse.

Nous avons démontré que deux pilines mineures sont nécessaires au déclenchement du recrutement de la plaque corticale. Les mutants dans *pilU* et *pilT* montrent que chacune de ces pilines semble capable de participer en absence de l'autre. Comment ces deux pilines s'organisent-elles pour déclencher la réponse cellulaire ? Pourquoi deux protéines partagent-elles une fonction redondante ?

Comme je l'ai expliqué, il existe deux modes d'action possibles pour ces protéines : soit elles agissent directement sur la surface membranaire de la cellule hôte, soit elles agissent sur la structure des pili.

Il existe un paradoxe dans mes résultats. L'analyse génétique semble montrer que ces deux protéines agissent exactement de la même manière. Elles partagent la même localisation dans les Pt4, les phénotypes des mutants sont absolument identiques et la même région de la protéine est essentielle. Pourtant, l'étude préliminaire avec les protéines MBP-piline confirme un possible rôle direct pour PilV mais l'exclut pour PilX seule. Le caractère préliminaire de ces résultats modère évidemment ce paradoxe, cependant les contrôles dans les expériences sont tous cohérents, et les protéines ont été produites en même temps, limitant la possibilité d'une erreur pour une seule d'entre elles.

Si les pilines agissent directement sur des récepteurs cellulaires, les différents phénotypes s'expliquent simplement par la quantité de protéines présentes à l'extérieur de la bactérie. Les deux pilines agiraient d'une manière très similaire, sur deux récepteurs différents ou sur le même récepteur. L'absence de l'une se traduisant par un signal insuffisant pour déclencher une réponse cellulaire observable. La quantité plus importante de protéines en absence de rétraction des pili permettrait de dépasser le seuil du signal.

Cette hypothèse simple implique deux choses : comme les mutants de *pilV* et *pilX* ont tous deux une capacité résiduelle à recruter l'eitrine, cela signifie que dans chacun des deux mutants, une autre protéine est capable d'agir. Cela suppose que les deux protéines PilV et PilX doivent être capables d'interagir directement et de manière équivalente. Dans le cas contraire, il faudrait imaginer qu'une autre protéine, peut-être une piline mineure inconnue, agisse directement, par exemple à la place de PilX. Notre analyse systématique du rôle des protéines Pil dans le recrutement de la plaque corticale ne laisse pas supposer que l'une des

autres protéines connues puisse jouer ce rôle comme PilX (bien que l'une des pseudopilines pourrait supporter une telle fonction). Le second corollaire est que : soit les résultats de l'étude préliminaire sont erronés, puisqu'elle ne met pas en évidence d'activité pour PilX ; soit le site actif de PilX nécessite son incorporation dans les pili pour être fonctionnel. Si PilX est une IUP, un tel site actif pourrait être induit au contact d'autres protéines dans les pili. Les régions déstructurées des IUP peuvent se structurer dans le cas d'interactions moléculaires.

Cependant, les mesures de la quantité de pili dans les différents mutants, même si elles ne sont pas toujours significatives, suggèrent un rôle possible des pilines mineures dans la stabilité des pili : en présence de capsule le mutant de *pilV* exprime 80% (+/-20) de pili, celui de *pilX* 50% (+/-25). Cette réduction de piliation est plus importante en absence de capsule. Si PilU assure effectivement la rétraction de pili particuliers, associés à la transduction du signal, et si PilV et PilX sont localisées dans ceux-ci, l'absence d'une des deux protéines se traduit alors par une déstabilisation de ces pili, donc une quasi-absence de ces pili à l'extérieur de la bactérie. Cela se traduirait par une perte de la fonction. Cette perte est compensable en forçant l'expression des pili par une mutation dans *pilU* ou par la stabilisation de ces pili à l'extérieur dans un mutant de *pilT*. Cependant, dans cette hypothèse, il faudrait expliquer quelle différence structurelle des pili de PilU, par rapport à ceux de PilT, est responsable de la transduction du signal.

L'hypothèse que je proposerais est simplement une association de ces deux hypothèses. Elle repose, en partie, sur l'existence de deux types de pili morphologiquement et fonctionnellement distincts, mais ne nécessite pas réellement cette caractéristique. Les pili formés par des mutants comme *pilC/pilT* ou *pilH/pilT* sont incapables de déclencher le recrutement de l'ezrine. Hanne Winter-larsen et coll. ont montré que PilV et PilX sont probablement absents de tels pili chez *N. gonorrhoeae* (Winther-Larsen *et al.*, 2001; Winther-Larsen *et al.*, 2005). Ce résultat démontre que la protéine PilE, qui forme la structure de ces pili, est incapable de déclencher la réponse cellulaire. Mes résultats suggèrent alors fortement que ce sont bien PilV et PilX qui agissent pour déclencher le recrutement de la plaque corticale. Il semble alors très probable que cette action est directe. Cela suppose donc que PilX agit également directement, certainement par un domaine nécessitant son incorporation dans les pili. Cependant, l'hypothèse selon laquelle PilU assurerait la rétraction de pili particuliers suppose que la structure des pili est différente selon les pilines mineures incorporées. Il est alors probable que la stabilité de ces pili repose, en partie, sur la présence de ces pilines mineures. L'absence de l'une entraînant alors une réduction de la quantité de pili. Cela participerait au défaut de recrutement très important observé chez les mutants de *pilV*

et *pilX*, défaut compensable par la restauration de ces pili à la surface de la bactérie en bloquant la fonctionnalité de PilU.

Perspectives

Mes travaux de thèses ont permis de progresser dans la compréhension des interactions entre *N. meningitidis* et son hôte et ont également ouvert de nouvelles perspectives de recherche. En particulier, le rôle des protéines PilV, PilX et PilU dans l'induction de la réorganisation du cytosquelette d'actine permettra d'élucider les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de cette interaction avec les cellules de l'hôte ainsi que de mieux comprendre le fonctionnement des Pt4.

Au niveau de la bactérie, les phénotypes des différents mutants testés ont permis de proposer de nouvelles théories sur le mode de fonctionnement des Pt4 (Figure 39). Le modèle selon lequel il existerait au moins deux types de Pt4 peut être confirmé par deux approches complémentaires.

Une première démonstration consiste à mettre en évidence le rôle de PilU dans la rétraction. Il est possible de tester le niveau d'expression des Pt4 de certains mutants. Par exemple, selon la théorie proposée, si PilU agit en formant un homohexamère indépendamment de la présence de PilT, alors les mutants *pilC,G,H,I,J,K/pilU* devraient exprimer des Pt4 dépendant de PilU alors que les mutants *pilC,G,H,I,J,K/pilT* exprimeraient des Pt4 dépendant de PilT. Ces Pt4 sont probablement détectables par ELISA ou par immunofluorescence. De plus, les travaux effectués sur *A. aeolicus* suggèrent qu'une étude *in vitro* de l'activité ATPase de la protéine PilU recombinante, en présence ou en absence de PilT, peut confirmer l'activité de la protéine PilU et nous renseigner plus précisément sur son fonctionnement (Herdendorf *et al.*, 2002 ; Satyshur *et al.*, 2007).

La seconde démonstration est basée sur le fait que la composition en pilines mineures est différente selon le type de Pt4. Une analyse de la composition des Pt4 en piline mineures par western blot en utilisant les mutants *pilC,G,H,I,J,K/pilU,T* peut démontrer le modèle (Figure 35). Dans les mutants de *pilU*, PilV et PilX seraient détectables mais pas ComP, et inversement dans les mutants de *pilT*. D'autre part, dans la Figure 36, le marquage par immunodétection de PilV(Flag) montre une quantité de pili restreinte par rapport au marquage des Pt4 totaux. Une détection des pili totaux et de PilV(Flag) sur les mêmes bactéries

montrerait si PilV(Flag) est localisée dans tous les pili ou seulement dans certains. La même expérience de détection des pilines mineures PilX et ComP dans les Pt4 compléterait l'étude.

A l'interface entre la bactérie et la cellule, nos résultats suggèrent que PilV et peut-être PilX et/ou PilE agissent directement sur la membrane plasmique eucaryote. Ces résultats préliminaires sont très encourageants. Si les protéines agissent directement, il reste à découvrir le ou les récepteurs avec lesquels elles interagissent. Cela pourra être fait par des expériences de pull-down ou par co-immunoprécipitation des pilines avec un lysat cellulaire ou une fraction membranaire de la cellule eucaryote. Il est également possible que ces protéines interagissent avec d'autres composants de la membrane plasmique comme cela a été montré chez *S. flexneri* dans le cas de l'interaction entre IpaB et le cholestérol membranaire (Schroeder and Hilbi, 2008). Il est possible d'étudier une telle interaction en utilisant les protéines recombinantes MBP-Pilines et la drogue M β CD dans une expérience similaire à celle présentée en Figure 37D.

D'après nos résultats, il n'est pas exclu que l'une des pseudopilines, PilH, PilI, PilJ ou PilK, agisse directement à la place de PilX. Dans ce cas, il faudrait reproduire les expériences avec les protéines recombinantes correspondantes pour déterminer laquelle de ces protéines agit.

Au niveau de la cellule hôte, la découverte de récepteurs aux pilines PilV, PilX ou PilE permettrait de déterminer quelle est la séquence d'événements aboutissant à la réorganisation du cytosquelette d'actine et au remodelage de la membrane plasmique.

Nous avons montré un rôle du cholestérol membranaire dans la voie de signalisation. Bien que cela reste à démontrer formellement, cette implication suggère un rôle des radeaux lipidiques dans cette réponse cellulaire. Ce résultat et pourrait fournir de nouvelles pistes dans l'étude des voies de signalisation activées par *N. meningitidis*.

Enfin, il serait intéressant de déterminer quelle est la différence entre les voies de signalisation activées par le méningocoque dans les cellules endothéliales et épithéliales (Coureuil *et al.*, 2009; Pujol *et al.*, 1997). Cette différence de réponse repose probablement sur l'expression différentielle de certaines molécules ou encore sur la structuration différente entre un épithélium polarisé, comme dans le nasopharynx, et un endothélium vasculaire sanguin. Une étude transcriptomique de la différence d'expression des gènes entre les cellules d'un épithélium polarisé et celles d'un endothélium vasculaire peut apporter de nouvelles pistes de recherche. De même, par analogie aux travaux effectués sur *P. aeruginosa*, la différence de réponse à l'infection par le méningocoque, d'un épithélium polarisé ou non, peut également nous renseigner sur les voies de signalisation activées par la bactérie (Gassama-Diagne *et al.*, 2006; Kierbel *et al.*, 2005).

Conclusion

Les Pt4 sont les pili les plus répandus chez les bactéries. Ils sont souvent essentiels à l'interaction des bactéries avec leur environnement. Les protéines PilV et PilX sont conservées au sein des bactéries à Gram négatif exprimant ces Pt4. En particulier, on les retrouve chez toutes les *Neisseria* dont on connaît la séquence génomique ainsi que chez *P. aeruginosa*. De plus, des orthologues de la protéine PilX sont retrouvés dans de nombreuses β et γ -protéobactéries (Pelicic, 2008).

Nous avons, pour la première fois, montré l'implication d'une piline mineure des Pt4 des *Neisseria* dans une interaction complexe avec la cellule hôte : l'induction de la réorganisation du cytosquelette d'actine. Nous avons également montré, au travers de deux études, le rôle de cette interaction dans le cycle de vie de la bactérie. Cette interaction est essentielle dans la vie commensale de *N. meningitidis* mais également dans sa pathogenèse.

Ces résultats permettront peut-être de comprendre des interactions similaires entre d'autres bactéries exprimant des Pt4 et leur hôte. En particulier, *P. aeruginosa* induit une réponse cellulaire ressemblant beaucoup à celle des *Neisseria* pathogènes. Quel est le rôle des Pt4 dans cette espèce ? Est-ce que cette réponse cellulaire nécessite la présence de PilV et/ou de PilX ?

Enfin, mes travaux montrent que les protéines PilV et PilX sont exposées à la surface des bactéries et essentielles dans la pathogenèse. Comme ces protéines sont très conservées chez le méningocoque, mais également chez le gonocoque, elles seraient toutes deux des cibles vaccinales intéressantes contre les maladies humaines provoquées par ces deux pathogènes.

VII. REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Aas, F.E., Lovold, C., and Koomey, M. (2002a) An inhibitor of DNA binding and uptake events dictates the proficiency of genetic transformation in *Neisseria gonorrhoeae*: mechanism of action and links to Type IV pilus expression. *Mol Microbiol* **46**: 1441-1450.
- Aas, F.E., Wolfgang, M., Frye, S., Dunham, S., Lovold, C., and Koomey, M. (2002b) Competence for natural transformation in *Neisseria gonorrhoeae*: components of DNA binding and uptake linked to type IV pilus expression. *Mol Microbiol* **46**: 749-760.
- Aas, F.E., Egge-Jacobsen, W., Winther-Larsen, H.C., Lovold, C., Hitchen, P.G., Dell, A., and Koomey, M. (2006) *Neisseria gonorrhoeae* type IV pili undergo multisite, hierarchical modifications with phosphoethanolamine and phosphocholine requiring an enzyme structurally related to lipopolysaccharide phosphoethanolamine transferases. *J Biol Chem* **281**: 27712-27723.
- Aas, F.E., Winther-Larsen, H.C., Wolfgang, M., Frye, S., Lovold, C., Roos, N., van Putten, J.P., and Koomey, M. (2007) Substitutions in the N-terminal alpha helical spine of *Neisseria gonorrhoeae* pilin affect Type IV pilus assembly, dynamics and associated functions. *Mol Microbiol* **63**: 69-85.
- Abbott, N.J., Ronnback, L., and Hansson, E. (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* **7**: 41-53.
- Achtman, M., Neibert, M., Crowe, B.A., Strittmatter, W., Kusecek, B., Weyse, E., Walsh, M.J., Slawig, B., Morelli, G., Moll, A., and et al. (1988) Purification and characterization of eight class 5 outer membrane protein variants from a clone of *Neisseria meningitidis* serogroup A. *J Exp Med* **168**: 507-525.
- Ala'Aldeen, D.A., Neal, K.R., Ait-Tahar, K., Nguyen-Van-Tam, J.S., English, A., Falla, T.J., Hawkey, P.M., and Slack, R.C. (2000) Dynamics of meningococcal long-term carriage among university students and their implications for mass vaccination. *J Clin Microbiol* **38**: 2311-2316.
- Avery, O.T., MacLeod, C.M., and McCarty, M. (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J Exp Med* **79**: 137-159.
- Balasingham, S.V., Collins, R.F., Assalkhou, R., Homberset, H., Frye, S.A., Derrick, J.P., and Tonjum, T. (2007) Interactions between the lipoprotein PilP and the secretin PilQ in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* **189**: 5716-5727.

- Bauer, F.J., Rudel, T., Stein, M., and Meyer, T.F. (1999) Mutagenesis of the *Neisseria gonorrhoeae* porin reduces invasion in epithelial cells and enhances phagocyte responsiveness. *Mol Microbiol* **31**: 903-913.
- Bayliss, C.D., van de Ven, T., and Moxon, E.R. (2002) Mutations in *polI* but not *mutSLH* destabilize *Haemophilus influenzae* tetranucleotide repeats. *Embo J* **21**: 1465-1476.
- Biais, N., Ladoux, B., Higashi, D., So, M., and Sheetz, M. (2008) Cooperative retraction of bundled type IV pili enables nanonewton force generation. *PLoS Biol* **6**: e87.
- Bierne, H., Sabet, C., Personnic, N., and Cossart, P. (2007) Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*. *Microbes Infect* **9**: 1156-1166.
- Bille, E., Zahar, J.R., Perrin, A., Morelle, S., Kriz, P., Jolley, K.A., Maiden, M.C., Dervin, C., Nassif, X., and Tinsley, C.R. (2005) A chromosomally integrated bacteriophage in invasive meningococci. *J Exp Med* **201**: 1905-1913.
- Bille, E., Ure, R., Gray, S.J., Kaczmarek, E.B., McCarthy, N.D., Nassif, X., Maiden, M.C., and Tinsley, C.R. (2008) Association of a bacteriophage with meningococcal disease in young adults. *PLoS ONE* **3**: e3885.
- Billker, O., Popp, A., Brinkmann, V., Wenig, G., Schneider, J., Caron, E., and Meyer, T.F. (2002) Distinct mechanisms of internalization of *Neisseria gonorrhoeae* by members of the CEACAM receptor family involving Rac1- and Cdc42-dependent and -independent pathways. *Embo J* **21**: 560-571.
- Blake, M.S., Blake, C.M., Apicella, M.A., and Mandrell, R.E. (1995) Gonococcal opacity: lectin-like interactions between Opa proteins and lipooligosaccharide. *Infect Immun* **63**: 1434-1439.
- Brehony, C., Jolley, K.A., and Maiden, M.C. (2007) Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease. *FEMS Microbiol Rev* **31**: 15-26.
- Broomes, E.L. (1975) Gonorrhea's Trojan horse: the asymptomatic female carrier. *J Natl Med Assoc* **67**: 468-470, 494.
- Burrows, L.L. (2005) Weapons of mass retraction. *Mol Microbiol* **57**: 878-888.
- Callaghan, M.J., Jolley, K.A., and Maiden, M.C. (2006) Opacity-associated adhesin repertoire in hyperinvasive *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **74**: 5085-5094.
- Capecchi, B., Adu-Bobie, J., Di Marcello, F., Ciocchi, L., Massignani, V., Taddei, A., Rappuoli, R., Pizza, M., and Arico, B. (2005) *Neisseria meningitidis* NadA is a new invasin which promotes bacterial adhesion to and penetration into human epithelial cells. *Mol Microbiol* **55**: 687-698.

- Capitani, G., Eidam, O., Glockshuber, R., and Grutter, M.G. (2006) Structural and functional insights into the assembly of type 1 pili from *Escherichia coli*. *Microbes Infect* **8**: 2284-2290.
- Carbonnelle, E., Helaine, S., Prouvensier, L., Nassif, X., and Pelicic, V. (2005) Type IV pilus biogenesis in *Neisseria meningitidis*: PilW is involved in a step occurring after pilus assembly, essential for fibre stability and function. *Mol Microbiol* **55**: 54-64.
- Carbonnelle, E., Helaine, S., Nassif, X., and Pelicic, V. (2006) A systematic genetic analysis in *Neisseria meningitidis* defines the Pil proteins required for assembly, functionality, stabilization and export of type IV pili. *Mol Microbiol* **61**: 1510-1522.
- Cartwright, K.A., Stuart, J.M., Jones, D.M., and Noah, N.D. (1987) The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. *Epidemiol Infect* **99**: 591-601.
- Cartwright, K.A., Jones, D.M., Smith, A.J., Stuart, J.M., Kaczmarek, E.B., and Palmer, S.R. (1991) Influenza A and meningococcal disease. *Lancet* **338**: 554-557.
- Caugant, D.A., Hoiby, E.A., Magnus, P., Scheel, O., Hoel, T., Bjune, G., Wedege, E., Eng, J., and Froholm, L.O. (1994) Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* in a randomly sampled population. *J Clin Microbiol* **32**: 323-330.
- Celli, J., Deng, W., and Finlay, B.B. (2000) Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) attachment to epithelial cells: exploiting the host cell cytoskeleton from the outside. *Cell Microbiol* **2**: 1-9.
- Chen, I., and Gotschlich, E.C. (2001) ComE, a competence protein from *Neisseria gonorrhoeae* with DNA-binding activity. *J Bacteriol* **183**: 3160-3168.
- Chen, X.M., Huang, B.Q., Splinter, P.L., Orth, J.D., Billadeau, D.D., McNiven, M.A., and LaRusso, N.F. (2004) Cdc42 and the actin-related protein/neural Wiskott-Aldrich syndrome protein network mediate cellular invasion by *Cryptosporidium parvum*. *Infect Immun* **72**: 3011-3021.
- Cheng, C.P., Herfkens, R.J., and Taylor, C.A. (2003) Inferior vena caval hemodynamics quantified in vivo at rest and during cycling exercise using magnetic resonance imaging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**: H1161-1167.
- Chiu, J.J., Lee, P.L., Chen, C.N., Lee, C.I., Chang, S.F., Chen, L.J., Lien, S.C., Ko, Y.C., Usami, S., and Chien, S. (2004) Shear stress increases ICAM-1 and decreases VCAM-1 and E-selectin expressions induced by tumor necrosis factor-[alpha] in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**: 73-79.

- Claus, H., Maiden, M.C., Maag, R., Frosch, M., and Vogel, U. (2002) Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport. *Microbiology* **148**: 1813-1819.
- Cohen, M.S., and Cannon, J.G. (1999) Human experimentation with *Neisseria gonorrhoeae*: progress and goals. *J Infect Dis* **179 Suppl 2**: S375-379.
- Collin, S., Guilvout, I., Chami, M., and Pugsley, A.P. (2007) YaeT-independent multimerization and outer membrane association of secretin PilD. *Mol Microbiol* **64**: 1350-1357.
- Collins, R.F., Ford, R.C., Kitmitto, A., Olsen, R.O., Tonjum, T., and Derrick, J.P. (2003) Three-dimensional structure of the *Neisseria meningitidis* secretin PilQ determined from negative-stain transmission electron microscopy. *J Bacteriol* **185**: 2611-2617.
- Collins, R.F., Frye, S.A., Kitmitto, A., Ford, R.C., Tonjum, T., and Derrick, J.P. (2004) Structure of the *Neisseria meningitidis* outer membrane PilQ secretin complex at 12 Å resolution. *J Biol Chem* **279**: 39750-39756.
- Comanducci, M., Bambini, S., Brunelli, B., Adu-Bobie, J., Arico, B., Capecchi, B., Giuliani, M.M., Masignani, V., Santini, L., Savino, S., Granoff, D.M., Caugant, D.A., Pizza, M., Rappuoli, R., and Mora, M. (2002) NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*. *J Exp Med* **195**: 1445-1454.
- Cossart, P., and Toledo-Arana, A. (2008) *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes Infect* **10**: 1041-1050.
- Coureuil, M., Mikaty, G., Miller, F., Lecuyer, H., Bernard, C., Bourdoulous, S., Dumenil, G., Mege, R.M., Weksler, B.B., Romero, I.A., Couraud, P.O., and Nassif, X. (2009) Meningococcal type IV pili recruit the polarity complex to cross the brain endothelium. *Science* **325**: 83-87.
- Craig, L., Pique, M.E., and Tainer, J.A. (2004) Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* **2**: 363-378.
- Craig, L., Volkmann, N., Arvai, A.S., Pique, M.E., Yeager, M., Egelman, E.H., and Tainer, J.A. (2006) Type IV pilus structure by cryo-electron microscopy and crystallography: implications for pilus assembly and functions. *Mol Cell* **23**: 651-662.
- Criss, A.K., and Seifert, H.S. (2006) Gonococci exit apically and basally from polarized epithelial cells and exhibit dynamic changes in type IV pili. *Cell Microbiol* **8**: 1430-1443.

- Crowther, L.J., Yamagata, A., Craig, L., Tainer, J.A., and Donnenberg, M.S. (2005) The ATPase activity of BfpD is greatly enhanced by zinc and allosteric interactions with other Bfp proteins. *J Biol Chem* **280**: 24839-24848.
- Darwin, C.R. (1872) *On the origin of species by means of Natural Selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life.*
- Davidson, T., and Tonjum, T. (2006) Meningococcal genome dynamics. *Nat Rev Microbiol* **4**: 11-22.
- Davies, P.F. (1995) Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* **75**: 519-560.
- de Bentzmann, S., Aurouze, M., Ball, G., and Filloux, A. (2006) FppA, a novel *Pseudomonas aeruginosa* prepilin peptidase involved in assembly of type IVb pili. *J Bacteriol* **188**: 4851-4860.
- de Jonge, M.I., Bos, M.P., Hamstra, H.J., Jiskoot, W., van Ulsen, P., Tommassen, J., van Alphen, L., and van der Ley, P. (2002) Conformational analysis of opacity proteins from *Neisseria meningitidis*. *Eur J Biochem* **269**: 5215-5223.
- Deghmane, A.E., Petit, S., Topilko, A., Pereira, Y., Giorgini, D., Larribe, M., and Taha, M.K. (2000) Intimate adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells is under the control of the *crgA* gene, a novel LysR-type transcriptional regulator. *Embo J* **19**: 1068-1078.
- Deghmane, A.E., Giorgini, D., Larribe, M., Alonso, J.M., and Taha, M.K. (2002) Down-regulation of pili and capsule of *Neisseria meningitidis* upon contact with epithelial cells is mediated by CrgA regulatory protein. *Mol Microbiol* **43**: 1555-1564.
- Dembo, M., Torney, D.C., Saxman, K., and Hammer, D. (1988) The reaction-limited kinetics of membrane-to-surface adhesion and detachment. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **234**: 55-83.
- Dietrich, G., Kurz, S., Hubner, C., Aepinus, C., Theiss, S., Guckenberger, M., Panzner, U., Weber, J., and Frosch, M. (2003) Transcriptome analysis of *Neisseria meningitidis* during infection. *J Bacteriol* **185**: 155-164.
- Doulet, N., Donnadiou, E., Laran-Chich, M.P., Niedergang, F., Nassif, X., Couraud, P.O., and Bourdoulous, S. (2006) *Neisseria meningitidis* infection of human endothelial cells interferes with leukocyte transmigration by preventing the formation of endothelial docking structures. *J Cell Biol* **173**: 627-637.

- Dove, J.E., Yasukawa, K., Tinsley, C.R., and Nassif, X. (2003) Production of the signalling molecule, autoinducer-2, by *Neisseria meningitidis*: lack of evidence for a concerted transcriptional response. *Microbiology* **149**: 1859-1869.
- Drake, S.L., and Koomey, M. (1995) The product of the pilQ gene is essential for the biogenesis of type IV pili in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* **18**: 975-986.
- Drake, S.L., Sandstedt, S.A., and Koomey, M. (1997) PilP, a pilus biogenesis lipoprotein in *Neisseria gonorrhoeae*, affects expression of PilQ as a high-molecular-mass multimer. *Mol Microbiol* **23**: 657-668.
- Dunn, K.L., Virji, M., and Moxon, E.R. (1995) Investigations into the molecular basis of meningococcal toxicity for human endothelial and epithelial cells: the synergistic effect of LPS and pili. *Microb Pathog* **18**: 81-96.
- Egile, C., Loisel, T.P., Laurent, V., Li, R., Pantaloni, D., Sansonetti, P.J., and Carlier, M.F. (1999) Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. *J Cell Biol* **146**: 1319-1332.
- Emonts, M., Hazelzet, J.A., de Groot, R., and Hermans, P.W. (2003) Host genetic determinants of *Neisseria meningitidis* infections. *Lancet Infect Dis* **3**: 565-577.
- Erales, J., Avilan, L., Lebreton, S., and Gontero, B. (2008) Exploring CP12 binding proteins revealed aldolase as a new partner for the phosphoribulokinase/glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase/CP12 complex--purification and kinetic characterization of this enzyme from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Febs J* **275**: 1248-1259.
- Erales, J., Lignon, S., and Gontero, B. (2009a) CP12 from *Chlamydomonas reinhardtii*, a permanent specific "chaperone-like" protein of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem* **284**: 12735-12744.
- Erales, J., Lorenzi, M., Lebrun, R., Fournel, A., Etienne, E., Courcelle, C., Guigliarelli, B., Gontero, B., and Belle, V. (2009b) A New Function of GAPDH from *Chlamydomonas reinhardtii*: A Thiol-Disulfide Exchange Reaction with CP12. *Biochemistry*.
- Eugene, E., Hoffmann, I., Pujol, C., Couraud, P.O., Bourdoulous, S., and Nassif, X. (2002) Microvilli-like structures are associated with the internalization of virulent capsulated *Neisseria meningitidis* into vascular endothelial cells. *J Cell Sci* **115**: 1231-1241.

- Findlow, H., Vogel, U., Mueller, J.E., Curry, A., Njanpop-Lafourcade, B.M., Claus, H., Gray, S.J., Yaro, S., Traore, Y., Sangare, L., Nicolas, P., Gessner, B.D., and Borrow, R. (2007) Three cases of invasive meningococcal disease caused by a capsule null locus strain circulating among healthy carriers in Burkina Faso. *J Infect Dis* **195**: 1071-1077.
- Finger, E.B., Puri, K.D., Alon, R., Lawrence, M.B., von Andrian, U.H., and Springer, T.A. (1996) Adhesion through L-selectin requires a threshold hydrodynamic shear. *Nature* **379**: 266-269.
- Forest, K.T., and Tainer, J.A. (1997) Type-4 pilus-structure: outside to inside and top to bottom--a minireview. *Gene* **192**: 165-169.
- Forest, K.T., Dunham, S.A., Koomey, M., and Tainer, J.A. (1999) Crystallographic structure reveals phosphorylated pilin from *Neisseria*: phosphoserine sites modify type IV pilus surface chemistry and fibre morphology. *Mol Microbiol* **31**: 743-752.
- Forest, K.T. (2008) The type II secretion arrowhead: the structure of GspI-GspJ-GspK. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 428-430.
- Francetic, O., Buddelmeijer, N., Lewenza, S., Kumamoto, C.A., and Pugsley, A.P. (2007) Signal recognition particle-dependent inner membrane targeting of the PulG Pseudopilin component of a type II secretion system. *J Bacteriol* **189**: 1783-1793.
- Frankel, G., and Phillips, A.D. (2008) Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal. *Cell Microbiol* **10**: 549-556.
- Fronzes, R., Remaut, H., and Waksman, G. (2008) Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *Embo J* **27**: 2271-2280.
- Fussenegger, M., Rudel, T., Barten, R., Ryll, R., and Meyer, T.F. (1997) Transformation competence and type-4 pilus biogenesis in *Neisseria gonorrhoeae*--a review. *Gene* **192**: 125-134.
- Gassama-Diagne, A., Yu, W., ter Beest, M., Martin-Belmonte, F., Kierbel, A., Engel, J., and Mostov, K. (2006) Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate regulates the formation of the basolateral plasma membrane in epithelial cells. *Nat Cell Biol* **8**: 963-970.
- Gaucher, C., Devaux, C., Boura, C., Lacolley, P., Stoltz, J.F., and Menu, P. (2007) In vitro impact of physiological shear stress on endothelial cells gene expression profile. *Clin Hemorheol Microcirc* **37**: 99-107.
- Geoffroy, M.C., Floquet, S., Metais, A., Nassif, X., and Pelicic, V. (2003) Large-scale analysis of the meningococcus genome by gene disruption: resistance to complement-mediated lysis. *Genome Res* **13**: 391-398.

- Gill, D.B., Koomey, M., Cannon, J.G., and Atkinson, J.P. (2003) Down-regulation of CD46 by piliated *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med* **198**: 1313-1322.
- Gill, D.B., and Atkinson, J.P. (2004) CD46 in *Neisseria* pathogenesis. *Trends Mol Med* **10**: 459-465.
- Gill, D.B., Spitzer, D., Koomey, M., Heuser, J.E., and Atkinson, J.P. (2005) Release of host-derived membrane vesicles following pilus-mediated adhesion of *Neisseria gonorrhoeae*. *Cell Microbiol* **7**: 1672-1683.
- Gnasso, A., Irace, C., Carallo, C., De Franceschi, M.S., Motti, C., Mattioli, P.L., and Pujia, A. (1997) In vivo association between low wall shear stress and plaque in subjects with asymmetrical carotid atherosclerosis. *Stroke* **28**: 993-998.
- Grassme, H.U., Ireland, R.M., and van Putten, J.P. (1996) Gonococcal opacity protein promotes bacterial entry-associated rearrangements of the epithelial cell actin cytoskeleton. *Infect Immun* **64**: 1621-1630.
- Greenblatt, J.J., Floyd, K., Philipps, M.E., and Frasch, C.E. (1988) Morphological differences in *Neisseria meningitidis* pili. *Infect Immun* **56**: 2356-2362.
- Grifantini, R., Bartolini, E., Muzzi, A., Draghi, M., Frigimelica, E., Berger, J., Randazzo, F., and Grandi, G. (2002) Gene expression profile in *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* upon host-cell contact: from basic research to vaccine development. *Ann N Y Acad Sci* **975**: 202-216.
- Griffiths, N.J., Bradley, C.J., Heyderman, R.S., and Virji, M. (2007) IFN-gamma amplifies NFkappaB-dependent *Neisseria meningitidis* invasion of epithelial cells via specific upregulation of CEA-related cell adhesion molecule 1. *Cell Microbiol* **9**: 2968-2983.
- Guyon, E. (2001) *Hydrodynamique Physique*.
- Haas, R., Schwarz, H., and Meyer, T.F. (1987) Release of soluble pilin antigen coupled with gene conversion in *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 9079-9083.
- Hadi, H.A., Wooldridge, K.G., Robinson, K., and Ala'Aldeen, D.A. (2001) Identification and characterization of App: an immunogenic autotransporter protein of *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **41**: 611-623.
- Hakkarainen, J., Toivanen, M., Leinonen, A., Frangmyr, L., Stromberg, N., Lapinjoki, S., Nassif, X., and Tikkanen-Kaukanen, C. (2005) Human and bovine milk oligosaccharides inhibit *Neisseria meningitidis* pili attachment in vitro. *J Nutr* **135**: 2445-2448.
- Hamilton, H.L., and Dillard, J.P. (2006) Natural transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: from DNA donation to homologous recombination. *Mol Microbiol* **59**: 376-385.

- Hammerschmidt, S., Muller, A., Sillmann, H., Muhlenhoff, M., Borrow, R., Fox, A., van Putten, J., Zollinger, W.D., Gerardy-Schahn, R., and Frosch, M. (1996) Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*siaD*): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. *Mol Microbiol* **20**: 1211-1220.
- Hardy, S.J., Christodoulides, M., Weller, R.O., and Heckels, J.E. (2000) Interactions of *Neisseria meningitidis* with cells of the human meninges. *Mol Microbiol* **36**: 817-829.
- Harrison, O.B., Evans, N.J., Blair, J.M., Grimes, H.S., Tinsley, C.R., Nassif, X., Kriz, P., Ure, R., Gray, S.J., Derrick, J.P., Maiden, M.C., and Feavers, I.M. (2009) Epidemiological Evidence for the Role of the Hemoglobin Receptor, HmbR, in Meningococcal Virulence. *J Infect Dis* **200**: 94-98.
- Harvey, H.A., Porat, N., Campbell, C.A., Jennings, M., Gibson, B.W., Phillips, N.J., Apicella, M.A., and Blake, M.S. (2000) Gonococcal lipooligosaccharide is a ligand for the asialoglycoprotein receptor on human sperm. *Mol Microbiol* **36**: 1059-1070.
- Hauck, C.R., and Meyer, T.F. (2003) 'Small' talk: Opa proteins as mediators of *Neisseria*-host-cell communication. *Curr Opin Microbiol* **6**: 43-49.
- Hazes, B., Sastry, P.A., Hayakawa, K., Read, R.J., and Irvin, R.T. (2000) Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin suggests a main-chain-dominated mode of receptor binding. *J Mol Biol* **299**: 1005-1017.
- Hegge, F.T., Hitchen, P.G., Aas, F.E., Kristiansen, H., Lovold, C., Egge-Jacobsen, W., Panico, M., Leong, W.Y., Bull, V., Virji, M., Morris, H.R., Dell, A., and Koomey, M. (2004) Unique modifications with phosphocholine and phosphoethanolamine define alternate antigenic forms of *Neisseria gonorrhoeae* type IV pili. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10798-10803.
- Helaine, S., Carbonnelle, E., Prouvensier, L., Beretti, J.L., Nassif, X., and Pelicic, V. (2005) PilX, a pilus-associated protein essential for bacterial aggregation, is a key to pilus-facilitated attachment of *Neisseria meningitidis* to human cells. *Mol Microbiol* **55**: 65-77.
- Helaine, S. (2006) Rôle de la piline mineure PilX dans l'adhésion de *Neisseria meningitidis* aux cellules humaines. In *INSERM U570*. Vol. PhD Paris: Paris 5- Rene Descartes.
- Helaine, S., Dyer, D.H., Nassif, X., Pelicic, V., and Forest, K.T. (2007) 3D structure/function analysis of PilX reveals how minor pilins can modulate the virulence properties of type IV pili. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 15888-15893.

- Henrichsen, J. (1972) Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev* **36**: 478-503.
- Herdendorf, T.J., McCaslin, D.R., and Forest, K.T. (2002) Aquifex aeolicus PilT, homologue of a surface motility protein, is a thermostable oligomeric NTPase. *J Bacteriol* **184**: 6465-6471.
- Higashi, D.L., Lee, S.W., Snyder, A., Weyand, N.J., Bakke, A., and So, M. (2007) Dynamics of *Neisseria gonorrhoeae* attachment: microcolony development, cortical plaque formation, and cytoprotection. *Infect Immun* **75**: 4743-4753.
- Hobbs, M.M., Seiler, A., Achtman, M., and Cannon, J.G. (1994) Microevolution within a clonal population of pathogenic bacteria: recombination, gene duplication and horizontal genetic exchange in the opa gene family of *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **12**: 171-180.
- Hoffmann, I., Eugene, E., Nassif, X., Couraud, P.O., and Bourdoulous, S. (2001) Activation of ErbB2 receptor tyrosine kinase supports invasion of endothelial cells by *Neisseria meningitidis*. *J Cell Biol* **155**: 133-143.
- Howie, H.L., Glogauer, M., and So, M. (2005) The *N. gonorrhoeae* type IV pilus stimulates mechanosensitive pathways and cytoprotection through a pilT-dependent mechanism. *PLoS Biol* **3**: e100.
- Irace, C., Cortese, C., Fiaschi, E., Carallo, C., Farinaro, E., and Gnasso, A. (2004) Wall shear stress is associated with intima-media thickness and carotid atherosclerosis in subjects at low coronary heart disease risk. *Stroke* **35**: 464-468.
- Jamet, A., Rousseau, C., Monfort, J.B., Frapy, E., Nassif, X., and Martin, P. (2009) A two-component system is required for colonization of host cells by meningococcus. *Microbiology*.
- Jones, A., Georg Lisa, M., Maudsdotter, L., and Jonsson, A.B. (2009) Endotoxin, Capsule and Bacterial Attachment Contribute to *Neisseria meningitidis* Resistance to the Human Antimicrobial Peptide, LL-37. *J Bacteriol*.
- Jonsson, A.B., Nyberg, G., and Normark, S. (1991) Phase variation of gonococcal pili by frameshift mutation in pilC, a novel gene for pilus assembly. *Embo J* **10**: 477-488.
- Jonsson, A.B., Rahman, M., and Normark, S. (1995) Pilus biogenesis gene, pilC, of *Neisseria gonorrhoeae*: pilC1 and pilC2 are each part of a larger duplication of the gonococcal genome and share upstream and downstream homologous sequences with opa and pil loci. *Microbiology* **141** (Pt 10): 2367-2377.

- Kahler, C.M., Martin, L.E., Shih, G.C., Rahman, M.M., Carlson, R.W., and Stephens, D.S. (1998) The (α 2-->8)-linked polysialic acid capsule and lipooligosaccharide structure both contribute to the ability of serogroup B *Neisseria meningitidis* to resist the bactericidal activity of normal human serum. *Infect Immun* **66**: 5939-5947.
- Kallstrom, H., Liszewski, M.K., Atkinson, J.P., and Jonsson, A.B. (1997) Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* **25**: 639-647.
- Kallstrom, H., Islam, M.S., Berggren, P.O., and Jonsson, A.B. (1998) Cell signaling by the type IV pili of pathogenic *Neisseria*. *J Biol Chem* **273**: 21777-21782.
- Kallstrom, H., Blackmer Gill, D., Albiger, B., Liszewski, M.K., Atkinson, J.P., and Jonsson, A.B. (2001) Attachment of *Neisseria gonorrhoeae* to the cellular pilus receptor CD46: identification of domains important for bacterial adherence. *Cell Microbiol* **3**: 133-143.
- Kierbel, A., Gassama-Diagne, A., Mostov, K., and Engel, J.N. (2005) The phosphoinositol-3-kinase-protein kinase B/Akt pathway is critical for *Pseudomonas aeruginosa* strain PAK internalization. *Mol Biol Cell* **16**: 2577-2585.
- Kimura, M. (1983) *Théorie neutraliste de l'évolution*: Flammarion.
- Kirchner, M., Heuer, D., and Meyer, T.F. (2005) CD46-independent binding of neisserial type IV pili and the major pilus adhesin, PilC, to human epithelial cells. *Infect Immun* **73**: 3072-3082.
- Kirchner, M., and Meyer, T.F. (2005) The PilC adhesin of the *Neisseria* type IV pilus-binding specificities and new insights into the nature of the host cell receptor. *Mol Microbiol* **56**: 945-957.
- Klauser, T., Pohlner, J., and Meyer, T.F. (1993) The secretion pathway of IgA protease-type proteins in gram-negative bacteria. *Bioessays* **15**: 799-805.
- Kline, K.A., Criss, A.K., Wallace, A., and Seifert, H.S. (2007) Transposon mutagenesis identifies sites upstream of the *Neisseria gonorrhoeae* pilE gene that modulate pilin antigenic variation. *J Bacteriol* **189**: 3462-3470.
- Kohl, P. (2005) Initiation à la rhéologie.
- Koomey, M., Gotschlich, E.C., Robbins, K., Bergstrom, S., and Swanson, J. (1987) Effects of recA mutations on pilus antigenic variation and phase transitions in *Neisseria gonorrhoeae*. *Genetics* **117**: 391-398.

- Koomey, M., Bergstrom, S., Blake, M., and Swanson, J. (1991) Pilin expression and processing in pilus mutants of *Neisseria gonorrhoeae*: critical role of Gly-1 in assembly. *Mol Microbiol* **5**: 279-287.
- Korotkov, K.V., and Hol, W.G. (2008) Structure of the GspK-GspI-GspJ complex from the enterotoxigenic *Escherichia coli* type 2 secretion system. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 462-468.
- Krogfelt, K.A., Bergmans, H., and Klemm, P. (1990) Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Infect Immun* **58**: 1995-1998.
- Kurzai, O., Schmitt, C., Claus, H., Vogel, U., Frosch, M., and Kolb-Maurer, A. (2005) Carbohydrate composition of meningococcal lipopolysaccharide modulates the interaction of *Neisseria meningitidis* with human dendritic cells. *Cell Microbiol* **7**: 1319-1334.
- Lafont, F., Abrami, L., and van der Goot, F.G. (2004) Bacterial subversion of lipid rafts. *Curr Opin Microbiol* **7**: 4-10.
- Lafont, F., and van der Goot, F.G. (2005) Bacterial invasion via lipid rafts. *Cell Microbiol* **7**: 613-620.
- Lai, S.K., Wang, Y.Y., Wirtz, D., and Hanes, J. (2009) Micro- and macrorheology of mucus. *Adv Drug Deliv Rev* **61**: 86-100.
- Lambden, P.R., Robertson, J.N., and Watt, P.J. (1980) Biological properties of two distinct pilus types produced by isogenic variants of *Neisseria gonorrhoeae* P9. *J Bacteriol* **141**: 393-396.
- Lambotin, M., Hoffmann, I., Laran-Chich, M.P., Nassif, X., Couraud, P.O., and Bourdoulous, S. (2005) Invasion of endothelial cells by *Neisseria meningitidis* requires cortactin recruitment by a phosphoinositide-3-kinase/Rac1 signalling pathway triggered by the lipo-oligosaccharide. *J Cell Sci* **118**: 3805-3816.
- Lappann, M., Haagensen, J.A., Claus, H., Vogel, U., and Molin, S. (2006) Meningococcal biofilm formation: structure, development and phenotypes in a standardized continuous flow system. *Mol Microbiol* **62**: 1292-1309.
- Lawrence, M.B., and Springer, T.A. (1991) Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* **65**: 859-873.
- Lawrence, M.B., and Springer, T.A. (1993) Neutrophils roll on E-selectin. *J Immunol* **151**: 6338-6346.

- Lawrence, M.B., Kansas, G.S., Kunkel, E.J., and Ley, K. (1997) Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L,P,E). *J Cell Biol* **136**: 717-727.
- Lee, J.S., Chang, M.I., Tseng, Y., and Wirtz, D. (2005a) Cdc42 mediates nucleus movement and MTOC polarization in Swiss 3T3 fibroblasts under mechanical shear stress. *Mol Biol Cell* **16**: 871-880.
- Lee, S.W., Bonnah, R.A., Higashi, D.L., Atkinson, J.P., Milgram, S.L., and So, M. (2002) CD46 is phosphorylated at tyrosine 354 upon infection of epithelial cells by *Neisseria gonorrhoeae*. *J Cell Biol* **156**: 951-957.
- Lee, S.W., Higashi, D.L., Snyder, A., Merz, A.J., Potter, L., and So, M. (2005b) PilT is required for PI(3,4,5)P₃-mediated crosstalk between *Neisseria gonorrhoeae* and epithelial cells. *Cell Microbiol* **7**: 1271-1284.
- Lehoux, S., Tronc, F., and Tedgui, A. (2002) Mechanisms of blood flow-induced vascular enlargement. *Biorheology* **39**: 319-324.
- Leimkugel, J., Hodgson, A., Forgor, A.A., Pfluger, V., Dangy, J.P., Smith, T., Achtman, M., Gagneux, S., and Pluschke, G. (2007) Clonal waves of *Neisseria* colonisation and disease in the African meningitis belt: eight- year longitudinal study in northern Ghana. *PLoS Med* **4**: e101.
- Lemarie, C.A., Esposito, B., Tedgui, A., and Lehoux, S. (2003) Pressure-induced vascular activation of nuclear factor-kappaB: role in cell survival. *Circ Res* **93**: 207-212.
- Linhartova, I., Basler, M., Ichikawa, J., Pelicic, V., Osicka, R., Lory, S., Nassif, X., and Sebo, P. (2006) Meningococcal adhesion suppresses proapoptotic gene expression and promotes expression of genes supporting early embryonic and cytoprotective signaling of human endothelial cells. *FEMS Microbiol Lett* **263**: 109-118.
- Mackinnon, F.G., Borrow, R., Gorringe, A.R., Fox, A.J., Jones, D.M., and Robinson, A. (1993) Demonstration of lipooligosaccharide immunotype and capsule as virulence factors for *Neisseria meningitidis* using an infant mouse intranasal infection model. *Microb Pathog* **15**: 359-366.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., and Spratt, B.G. (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 3140-3145.
- Maier, B., Potter, L., So, M., Long, C.D., Seifert, H.S., and Sheetz, M.P. (2002) Single pilus motor forces exceed 100 pN. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 16012-16017.

- Mairey, E., Genovesio, A., Donnadieu, E., Bernard, C., Jaubert, F., Pinard, E., Seylaz, J., Olivo-Marin, J.C., Nassif, X., and Dumenil, G. (2006) Cerebral microcirculation shear stress levels determine *Neisseria meningitidis* attachment sites along the blood-brain barrier. *J Exp Med* **203**: 1939-1950.
- Mairey, E. (2007) Propriétés mécaniques du processus d'adhésion de *Neisseria meningitidis* à la barrière hémato-encéphalique. Paris.
- Malek, A.M., Alper, S.L., and Izumo, S. (1999) Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *Jama* **282**: 2035-2042.
- Manning, P.A. (1997) The tcp gene cluster of *Vibrio cholerae*. *Gene* **192**: 63-70.
- Marceau, M., Beretti, J.L., and Nassif, X. (1995) High adhesiveness of encapsulated *Neisseria meningitidis* to epithelial cells is associated with the formation of bundles of pili. *Mol Microbiol* **17**: 855-863.
- Marceau, M., Forest, K., Beretti, J.L., Tainer, J., and Nassif, X. (1998) Consequences of the loss of O-linked glycosylation of meningococcal type IV pilin on piliation and pilus-mediated adhesion. *Mol Microbiol* **27**: 705-715.
- Marceau, M., and Nassif, X. (1999) Role of glycosylation at Ser63 in production of soluble pilin in pathogenic *Neisseria*. *J Bacteriol* **181**: 656-661.
- Marshall, B.T., Long, M., Piper, J.W., Yago, T., McEver, R.P., and Zhu, C. (2003) Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. *Nature* **423**: 190-193.
- Martin, P., van de Ven, T., Mouchel, N., Jeffries, A.C., Hood, D.W., and Moxon, E.R. (2003) Experimentally revised repertoire of putative contingency loci in *Neisseria meningitidis* strain MC58: evidence for a novel mechanism of phase variation. *Mol Microbiol* **50**: 245-257.
- Martin, P., Sun, L., Hood, D.W., and Moxon, E.R. (2004) Involvement of genes of genome maintenance in the regulation of phase variation frequencies in *Neisseria meningitidis*. *Microbiology* **150**: 3001-3012.
- Martin, P., Makepeace, K., Hill, S.A., Hood, D.W., and Moxon, E.R. (2005) Microsatellite instability regulates transcription factor binding and gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 3800-3804.
- Massari, P., Visintin, A., Gunawardana, J., Halmen, K.A., King, C.A., Golenbock, D.T., and Wetzler, L.M. (2006) Meningococcal porin PorB binds to TLR2 and requires TLR1 for signaling. *J Immunol* **176**: 2373-2380.

- McCormick, S.M., Eskin, S.G., McIntire, L.V., Teng, C.L., Lu, C.M., Russell, C.G., and Chittur, K.K. (2001) DNA microarray reveals changes in gene expression of shear stressed human umbilical vein endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8955-8960.
- McEver, R.P. (2002) Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr Opin Cell Biol* **14**: 581-586.
- McNeil, G., Virji, M., and Moxon, E.R. (1994) Interactions of *Neisseria meningitidis* with human monocytes. *Microb Pathog* **16**: 153-163.
- Merz, A.J., and So, M. (1997) Attachment of piliated, Opa- and Opc- gonococci and meningococci to epithelial cells elicits cortical actin rearrangements and clustering of tyrosine-phosphorylated proteins. *Infect Immun* **65**: 4341-4349.
- Merz, A.J., Enns, C.A., and So, M. (1999) Type IV pili of pathogenic *Neisseriae* elicit cortical plaque formation in epithelial cells. *Mol Microbiol* **32**: 1316-1332.
- Mikaty, G., Soyer, M., Mairey, E., Henry, N., Dyer, D., Forest, K.T., Morand, P., Guadagnini, S., Prevost, M.C., Nassif, X., and Dumenil, G. (2009) Extracellular bacterial pathogen induces host cell surface reorganization to resist shear stress. *PLoS Pathog* **5**: e1000314.
- Morand, P.C., Bille, E., Morelle, S., Eugene, E., Beretti, J.L., Wolfgang, M., Meyer, T.F., Koomey, M., and Nassif, X. (2004) Type IV pilus retraction in pathogenic *Neisseria* is regulated by the PilC proteins. *Embo J* **23**: 2009-2017.
- Morelle, S., Carbonnelle, E., and Nassif, X. (2003) The REP2 repeats of the genome of *Neisseria meningitidis* are associated with genes coordinately regulated during bacterial cell interaction. *J Bacteriol* **185**: 2618-2627.
- Moxon, E.R., Rainey, P.B., Nowak, M.A., and Lenski, R.E. (1994) Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Curr Biol* **4**: 24-33.
- Nagaoka, T., and Yoshida, A. (2006) Noninvasive evaluation of wall shear stress on retinal microcirculation in humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**: 1113-1119.
- Nagel, T., Resnick, N., Atkinson, W.J., Dewey, C.F., Jr., and Gimbrone, M.A., Jr. (1994) Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* **94**: 885-891.
- Nakagawa, H., Miki, H., Ito, M., Ohashi, K., Takenawa, T., and Miyamoto, S. (2001) N-WASP, WAVE and Mena play different roles in the organization of actin cytoskeleton in lamellipodia. *J Cell Sci* **114**: 1555-1565.

- Nassif, X., Lowy, J., Stenberg, P., O'Gaora, P., Ganji, A., and So, M. (1993) Antigenic variation of pilin regulates adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells. *Mol Microbiol* **8**: 719-725.
- Nassif, X., Beretti, J.L., Lowy, J., Stenberg, P., O'Gaora, P., Pfeifer, J., Normark, S., and So, M. (1994) Roles of pilin and PilC in adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 3769-3773.
- Nassif, X., and So, M. (1995) Interaction of pathogenic neisseriae with nonphagocytic cells. *Clin Microbiol Rev* **8**: 376-388.
- Nassif, X., Marceau, M., Pujol, C., Pron, B., Beretti, J.L., and Taha, M.K. (1997) Type-4 pili and meningococcal adhesiveness. *Gene* **192**: 149-153.
- Nassif, X., Bourdoulous, S., Eugene, E., and Couraud, P.O. (2002) How do extracellular pathogens cross the blood-brain barrier? *Trends Microbiol* **10**: 227-232.
- Neil, R.B., and Apicella, M.A. (2009) Role of HrpA in biofilm formation of *Neisseria meningitidis* and regulation of the hrpBAS transcripts. *Infect Immun*.
- Niggli, V., and Rossy, J. (2008) Ezrin/radixin/moesin: versatile controllers of signaling molecules and of the cortical cytoskeleton. *Int J Biochem Cell Biol* **40**: 344-349.
- Noria, S., Xu, F., McCue, S., Jones, M., Gotlieb, A.I., and Langille, B.L. (2004) Assembly and reorientation of stress fibers drives morphological changes to endothelial cells exposed to shear stress. *Am J Pathol* **164**: 1211-1223.
- Nudleman, E., and Kaiser, D. (2004) Pulling together with type IV pili. *J Mol Microbiol Biotechnol* **7**: 52-62.
- Nunn, D. (1999) Bacterial type II protein export and pilus biogenesis: more than just homologies? *Trends Cell Biol* **9**: 402-408.
- Nunn, D.N., and Lory, S. (1991) Product of the *Pseudomonas aeruginosa* gene pilD is a prepilin leader peptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 3281-3285.
- O'Hara, S.P., Small, A.J., Chen, X.M., and LaRusso, N.F. (2008) Host cell actin remodeling in response to *Cryptosporidium*. *Subcell Biochem* **47**: 92-100.
- Ohkubo, T., Fukazawa, R., Ikegami, E., and Ogawa, S. (2007) Reduced shear stress and disturbed flow may lead to coronary aneurysm and thrombus formations. *Pediatr Int* **49**: 1-7.
- Oldfield, N.J., Bland, S.J., Taraktsoglou, M., Dos Ramos, F.J., Robinson, K., Wooldridge, K.G., and Ala'Aldeen, D.A. (2007) T-cell stimulating protein A (TspA) of *Neisseria meningitidis* is required for optimal adhesion to human cells. *Cell Microbiol* **9**: 463-478.

- Osborn, E.A., Rabodzey, A., Dewey, C.F., Jr., and Hartwig, J.H. (2006) Endothelial actin cytoskeleton remodeling during mechanostimulation with fluid shear stress. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**: C444-452.
- Oyre, S., Pedersen, E.M., Ringgaard, S., Boesiger, P., and Paaske, W.P. (1997) In vivo wall shear stress measured by magnetic resonance velocity mapping in the normal human abdominal aorta. *Eur J Vasc Endovasc Surg* **13**: 263-271.
- Oyre, S., Ringgaard, S., Kozerke, S., Paaske, W.P., Erlandsen, M., Boesiger, P., and Pedersen, E.M. (1998) Accurate noninvasive quantitation of blood flow, cross-sectional lumen vessel area and wall shear stress by three-dimensional paraboloid modeling of magnetic resonance imaging velocity data. *J Am Coll Cardiol* **32**: 128-134.
- Parent du Châtelet, I., Taha, M.K., A., L., and D., L.-B. (2007) Les infections invasives à méningocoques en France en 2006. *B.E.H.* **10**: 51-52.
- Parge, H.E., Forest, K.T., Hickey, M.J., Christensen, D.A., Getzoff, E.D., and Tainer, J.A. (1995) Structure of the fibre-forming protein pilin at 2.6 Å resolution. *Nature* **378**: 32-38.
- Park, H.S., Wolfgang, M., van Putten, J.P., Dorward, D., Hayes, S.F., and Koomey, M. (2001) Structural alterations in a type IV pilus subunit protein result in concurrent defects in multicellular behaviour and adherence to host tissue. *Mol Microbiol* **42**: 293-307.
- Park, H.S., Wolfgang, M., and Koomey, M. (2002) Modification of type IV pilus-associated epithelial cell adherence and multicellular behavior by the PilU protein of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* **70**: 3891-3903.
- Pathan, N., Faust, S.N., and Levin, M. (2003) Pathophysiology of meningococcal meningitis and septicaemia. *Arch Dis Child* **88**: 601-607.
- Pavliak, V., Brisson, J.R., Michon, F., Uhrin, D., and Jennings, H.J. (1993) Structure of the sialylated L3 lipopolysaccharide of *Neisseria meningitidis*. *J Biol Chem* **268**: 14146-14152.
- Pelicic, V. (2008) Type IV pili: e pluribus unum? *Mol Microbiol* **68**: 827-837.
- Perkins-Balding, D., Ratliff-Griffin, M., and Stojiljkovic, I. (2004) Iron transport systems in *Neisseria meningitidis*. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 154-171.
- Perrin, A., Bonacorsi, S., Carbonnelle, E., Talibi, D., Dessen, P., Nassif, X., and Tinsley, C. (2002) Comparative genomics identifies the genetic islands that distinguish *Neisseria meningitidis*, the agent of cerebrospinal meningitis, from other *Neisseria* species. *Infect Immun* **70**: 7063-7072.

- Pierres, A., Benoliel, A.M., and Bongrand, P. (1996) Measuring bonds between surface-associated molecules. *J Immunol Methods* **196**: 105-120.
- Pierres, A., Benoliel, A.M., and Bongrand, P. (2003) [The concept of catch bonds for molecular interactions]. *Med Sci (Paris)* **19**: 1175-1179.
- Planet, P.J., Kachlany, S.C., DeSalle, R., and Figurski, D.H. (2001) Phylogeny of genes for secretion NTPases: identification of the widespread tadA subfamily and development of a diagnostic key for gene classification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2503-2508.
- Plant, L., Asp, V., Lovkvist, L., Sundqvist, J., and Jonsson, A.B. (2004) Epithelial cell responses induced upon adherence of pathogenic *Neisseria*. *Cell Microbiol* **6**: 663-670.
- Plant, L., Sundqvist, J., Zughaier, S., Lovkvist, L., Stephens, D.S., and Jonsson, A.B. (2006) Lipooligosaccharide structure contributes to multiple steps in the virulence of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **74**: 1360-1367.
- Plant, L.J., and Jonsson, A.B. (2006) Type IV pili of *Neisseria gonorrhoeae* influence the activation of human CD4⁺ T cells. *Infect Immun* **74**: 442-448.
- Porat, N., Apicella, M.A., and Blake, M.S. (1995) A lipooligosaccharide-binding site on HepG2 cells similar to the gonococcal opacity-associated surface protein Opa. *Infect Immun* **63**: 2164-2172.
- Power, P.M., Roddam, L.F., Rutter, K., Fitzpatrick, S.Z., Srikhanta, Y.N., and Jennings, M.P. (2003) Genetic characterization of pilin glycosylation and phase variation in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **49**: 833-847.
- Pries, A.R., Secomb, T.W., Gessner, T., Sperandio, M.B., Gross, J.F., and Gaehtgens, P. (1994) Resistance to blood flow in microvessels in vivo. *Circ Res* **75**: 904-915.
- Pron, B., Taha, M.K., Rambaud, C., Fournet, J.C., Pattey, N., Monnet, J.P., Musilek, M., Beretti, J.L., and Nassif, X. (1997) Interaction of *Neisseria meningitidis* with the components of the blood-brain barrier correlates with an increased expression of PilC. *J Infect Dis* **176**: 1285-1292.
- Pujol, C., Eugene, E., de Saint Martin, L., and Nassif, X. (1997) Interaction of *Neisseria meningitidis* with a polarized monolayer of epithelial cells. *Infect Immun* **65**: 4836-4842.
- Pujol, C., Eugene, E., Marceau, M., and Nassif, X. (1999) The meningococcal PilT protein is required for induction of intimate attachment to epithelial cells following pilus-mediated adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4017-4022.

- Rahman, M., Kallstrom, H., Normark, S., and Jonsson, A.B. (1997) PilC of pathogenic *Neisseria* is associated with the bacterial cell surface. *Mol Microbiol* **25**: 11-25.
- Ram, S., Cullinane, M., Blom, A.M., Gulati, S., McQuillen, D.P., Boden, R., Monks, B.G., O'Connell, C., Elkins, C., Pangburn, M.K., Dahlback, B., and Rice, P.A. (2001) C4bp binding to porin mediates stable serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae*. *Int Immunopharmacol* **1**: 423-432.
- Rameix-Welti, M.A., Zarantonelli, M.L., Giorgini, D., Ruckly, C., Marasescu, M., van der Werf, S., Alonso, J.M., Naffakh, N., and Taha, M.K. (2009) Influenza A virus neuraminidase enhances meningococcal adhesion to epithelial cells through interaction with sialic acid-containing meningococcal capsules. *Infect Immun.*
- Read, R.C., Fox, A., Miller, K., Gray, T., Jones, N., Borrows, R., Jones, D.M., and Finch, R.G. (1995) Experimental infection of human nasal mucosal explants with *Neisseria meningitidis*. *J Med Microbiol* **42**: 353-361.
- Read, R.C., Goodwin, L., Parsons, M.A., Silcocks, P., Kaczmarek, E.B., Parker, A., and Baldwin, T.J. (1999) Coinfection with influenza B virus does not affect association of *Neisseria meningitidis* with human nasopharyngeal mucosa in organ culture. *Infect Immun* **67**: 3082-3086.
- Rechner, C., Kuhlewein, C., Muller, A., Schild, H., and Rudel, T. (2007) Host glycoprotein Gp96 and scavenger receptor SREC interact with PorB of disseminating *Neisseria gonorrhoeae* in an epithelial invasion pathway. *Cell Host Microbe* **2**: 393-403.
- Richardson, A.R., and Stojiljkovic, I. (2001) Mismatch repair and the regulation of phase variation in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **40**: 645-655.
- Roberts, L. (2008) Infectious disease. An ill wind, bringing meningitis. *Science* **320**: 1710-1715.
- Rudel, T., Boxberger, H.J., and Meyer, T.F. (1995a) Pilus biogenesis and epithelial cell adherence of *Neisseria gonorrhoeae* pilC double knock-out mutants. *Mol Microbiol* **17**: 1057-1071.
- Rudel, T., Scheurerpflug, I., and Meyer, T.F. (1995b) *Neisseria* PilC protein identified as type-4 pilus tip-located adhesin. *Nature* **373**: 357-359.
- Satyshur, K.A., Worzalla, G.A., Meyer, L.S., Heiniger, E.K., Aukema, K.G., Misic, A.M., and Forest, K.T. (2007) Crystal structures of the pilus retraction motor PilT suggest large domain movements and subunit cooperation drive motility. *Structure* **15**: 363-376.

- Saunders, N.J., Jeffries, A.C., Peden, J.F., Hood, D.W., Tettelin, H., Rappuoli, R., and Moxon, E.R. (2000) Repeat-associated phase variable genes in the complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* strain MC58. *Mol Microbiol* **37**: 207-215.
- Sauvonnet, N., Vignon, G., Pugsley, A.P., and Gounon, P. (2000) Pilus formation and protein secretion by the same machinery in *Escherichia coli*. *Embo J* **19**: 2221-2228.
- Scarselli, M., Serruto, D., Montanari, P., Capecchi, B., Adu-Bobie, J., Veggi, D., Rappuoli, R., Pizza, M., and Arico, B. (2006) *Neisseria meningitidis* NhhA is a multifunctional trimeric autotransporter adhesin. *Mol Microbiol* **61**: 631-644.
- Schmitt, C., Turner, D., Boesl, M., Abele, M., Frosch, M., and Kurzai, O. (2007) A functional two-partner secretion system contributes to adhesion of *Neisseria meningitidis* to epithelial cells. *J Bacteriol* **189**: 7968-7976.
- Schneider, M.C., Exley, R.M., Ram, S., Sim, R.B., and Tang, C.M. (2007) Interactions between *Neisseria meningitidis* and the complement system. *Trends Microbiol* **15**: 233-240.
- Schneider, M.C., Prosser, B.E., Caesar, J.J., Kugelberg, E., Li, S., Zhang, Q., Quoraishi, S., Lovett, J.E., Deane, J.E., Sim, R.B., Roversi, P., Johnson, S., Tang, C.M., and Lea, S.M. (2009) *Neisseria meningitidis* recruits factor H using protein mimicry of host carbohydrates. *Nature* **458**: 890-893.
- Schrodinger, E. (1944) *What is Life?*: Cambridge University.
- Schroeder, G.N., and Hilbi, H. (2008) Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin Microbiol Rev* **21**: 134-156.
- Schryvers, A.B., and Stojiljkovic, I. (1999) Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* **32**: 1117-1123.
- Schubert, W.D., Urbanke, C., Ziehm, T., Beier, V., Machner, M.P., Domann, E., Wehland, J., Chakraborty, T., and Heinz, D.W. (2002) Structure of internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes*, in complex with its human receptor E-cadherin. *Cell* **111**: 825-836.
- Serruto, D., Adu-Bobie, J., Scarselli, M., Veggi, D., Pizza, M., Rappuoli, R., and Arico, B. (2003) *Neisseria meningitidis* App, a new adhesin with autocatalytic serine protease activity. *Mol Microbiol* **48**: 323-334.
- Severac, D., Bura-Rivière, A., and Boccalon, H. (2007) Physiologie et exploration de la circulation artérielle. *podologie*.

- Shaw, J.H., and Falkow, S. (1988) Model for invasion of human tissue culture cells by *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* **56**: 1625-1632.
- Sheikh, S., Rainger, G.E., Gale, Z., Rahman, M., and Nash, G.B. (2003) Exposure to fluid shear stress modulates the ability of endothelial cells to recruit neutrophils in response to tumor necrosis factor-alpha: a basis for local variations in vascular sensitivity to inflammation. *Blood* **102**: 2828-2834.
- Shen, Y., Naujokas, M., Park, M., and Ireton, K. (2000) InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* **103**: 501-510.
- Simmers, M.B., Pryor, A.W., and Blackman, B.R. (2007) Arterial shear stress regulates endothelial cell-directed migration, polarity, and morphology in confluent monolayers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**: H1937-1946.
- Simons, K., and Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 31-39.
- Sjolinder, H., and Jonsson, A.B. (2007) Imaging of disease dynamics during meningococcal sepsis. *PLoS ONE* **2**: e241.
- Sjolinder, H., Eriksson, J., Maudsdotter, L., Aro, H., and Jonsson, A.B. (2008) Meningococcal outer membrane protein NhhA is essential for colonization and disease by preventing phagocytosis and complement attack. *Infect Immun* **76**: 5412-5420.
- Skoudy, A., Nhieu, G.T., Mantis, N., Arpin, M., Mounier, J., Gounon, P., and Sansonetti, P. (1999) A functional role for ezrin during *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J Cell Sci* **112** (Pt 13): 2059-2068.
- Skoudy, A., Mounier, J., Aruffo, A., Ohayon, H., Gounon, P., Sansonetti, P., and Tran Van Nhieu, G. (2000) CD44 binds to the *Shigella* IpaB protein and participates in bacterial invasion of epithelial cells. *Cell Microbiol* **2**: 19-33.
- Snyder, L.A., Saunders, N.J., and Shafer, W.M. (2001) A putatively phase variable gene (*dca*) required for natural competence in *Neisseria gonorrhoeae* but not *Neisseria meningitidis* is located within the division cell wall (*dcw*) gene cluster. *J Bacteriol* **183**: 1233-1241.
- Sokurenko, E.V., Courtney, H.S., Ohman, D.E., Klemm, P., and Hasty, D.L. (1994) FimH family of type 1 fimbrial adhesins: functional heterogeneity due to minor sequence variations among *fimH* genes. *J Bacteriol* **176**: 748-755.
- Sokurenko, E.V., Courtney, H.S., Maslow, J., Siitonen, A., and Hasty, D.L. (1995) Quantitative differences in adhesiveness of type 1 fimbriated *Escherichia coli* due to structural differences in *fimH* genes. *J Bacteriol* **177**: 3680-3686.

- Sokurenko, E.V., Chesnokova, V., Doyle, R.J., and Hasty, D.L. (1997) Diversity of the *Escherichia coli* type 1 fimbrial lectin. Differential binding to mannosides and uroepithelial cells. *J Biol Chem* **272**: 17880-17886.
- Song, W., Ma, L., Chen, R., and Stein, D.C. (2000) Role of lipooligosaccharide in Opa-independent invasion of *Neisseria gonorrhoeae* into human epithelial cells. *J Exp Med* **191**: 949-960.
- Stephens, D.S., and McGee, Z.A. (1981) Attachment of *Neisseria meningitidis* to human mucosal surfaces: influence of pili and type of receptor cell. *J Infect Dis* **143**: 525-532.
- Stephens, D.S., Hoffman, L.H., and McGee, Z.A. (1983) Interaction of *Neisseria meningitidis* with human nasopharyngeal mucosa: attachment and entry into columnar epithelial cells. *J Infect Dis* **148**: 369-376.
- Stephens, D.S., Whitney, A.M., Melly, M.A., Hoffman, L.H., Farley, M.M., and Frasch, C.E. (1986) Analysis of damage to human ciliated nasopharyngeal epithelium by *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **51**: 579-585.
- Stephens, D.S. (1989) Gonococcal and meningococcal pathogenesis as defined by human cell, cell culture, and organ culture assays. *Clin Microbiol Rev* **2 Suppl**: S104-111.
- Stephens, D.S., Spellman, P.A., and Swartley, J.S. (1993) Effect of the (α 2 \rightarrow 8)-linked polysialic acid capsule on adherence of *Neisseria meningitidis* to human mucosal cells. *J Infect Dis* **167**: 475-479.
- Stevanin, T.M., Laver, J.R., Poole, R.K., Moir, J.W., and Read, R.C. (2007) Metabolism of nitric oxide by *Neisseria meningitidis* modifies release of NO-regulated cytokines and chemokines by human macrophages. *Microbes Infect* **9**: 981-987.
- Stimson, E., Virji, M., Makepeace, K., Dell, A., Morris, H.R., Payne, G., Saunders, J.R., Jennings, M.P., Barker, S., Panico, M., and et al. (1995) Meningococcal pilin: a glycoprotein substituted with digalactosyl 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyhexose. *Mol Microbiol* **17**: 1201-1214.
- Stimson, E., Virji, M., Barker, S., Panico, M., Blench, I., Saunders, J., Payne, G., Moxon, E.R., Dell, A., and Morris, H.R. (1996) Discovery of a novel protein modification: α -glycerophosphate is a substituent of meningococcal pilin. *Biochem J* **316 (Pt 1)**: 29-33.
- Strom, M.S., Nunn, D.N., and Lory, S. (1993) A single bifunctional enzyme, PilD, catalyzes cleavage and N-methylation of proteins belonging to the type IV pilin family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 2404-2408.

- Stuart, J.M., Cartwright, K.A., Robinson, P.M., and Noah, N.D. (1989) Effect of smoking on meningococcal carriage. *Lancet* **2**: 723-725.
- Sun, Y.H., Bakshi, S., Chalmers, R., and Tang, C.M. (2000) Functional genomics of *Neisseria meningitidis* pathogenesis. *Nat Med* **6**: 1269-1273.
- Swanson, K.V., Jarvis, G.A., Brooks, G.F., Barham, B.J., Cooper, M.D., and Griffiss, J.M. (2001) CEACAM is not necessary for *Neisseria gonorrhoeae* to adhere to and invade female genital epithelial cells. *Cell Microbiol* **3**: 681-691.
- Taha, M.K., Deghmane, A.E., Antignac, A., Zarantonelli, M.L., Larribe, M., and Alonso, J.M. (2002) The duality of virulence and transmissibility in *Neisseria meningitidis*. *Trends Microbiol* **10**: 376-382.
- Tala, A., Progida, C., De Stefano, M., Cogli, L., Spinosa, M.R., Bucci, C., and Alifano, P. (2008) The HrpB-HrpA two-partner secretion system is essential for intracellular survival of *Neisseria meningitidis*. *Cell Microbiol* **10**: 2461-2482.
- Taniguchi, T., Akeda, Y., Haba, A., Yasuda, Y., Yamamoto, K., Honda, T., and Tochikubo, K. (2001) Gene cluster for assembly of pilus colonization factor antigen III of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **69**: 5864-5873.
- Telford, J.L., Barocchi, M.A., Margarit, I., Rappuoli, R., and Grandi, G. (2006) Pili in gram-positive pathogens. *Nat Rev Microbiol* **4**: 509-519.
- Thomas, W.E., Nilsson, L.M., Forero, M., Sokurenko, E.V., and Vogel, V. (2004) Shear-dependent 'stick-and-roll' adhesion of type 1 fimbriated *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **53**: 1545-1557.
- Topper, J.N., and Gimbrone, M.A., Jr. (1999) Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype. *Mol Med Today* **5**: 40-46.
- Tran Van Nhieu, G., Caron, E., Hall, A., and Sansonetti, P.J. (1999) IpaC induces actin polymerization and filopodia formation during *Shigella* entry into epithelial cells. *Embo J* **18**: 3249-3262.
- Treangen, T.J., Ambur, O.H., Tonjum, T., and Rocha, E.P. (2008) The impact of the neisserial DNA uptake sequences on genome evolution and stability. *Genome Biol* **9**: R60.
- Tunkel, A.R., and Scheld, W.M. (1993) Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. *Annu Rev Med* **44**: 103-120.
- Turner, D.P., Marietou, A.G., Johnston, L., Ho, K.K., Rogers, A.J., Wooldridge, K.G., and Ala'Aldeen, D.A. (2006) Characterization of MspA, an immunogenic autotransporter protein that mediates adhesion to epithelial and endothelial cells in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **74**: 2957-2964.

- Unkmeir, A., Kammerer, U., Stade, A., Hubner, C., Haller, S., Kolb-Maurer, A., Frosch, M., and Dietrich, G. (2002a) Lipooligosaccharide and polysaccharide capsule: virulence factors of *Neisseria meningitidis* that determine meningococcal interaction with human dendritic cells. *Infect Immun* **70**: 2454-2462.
- Unkmeir, A., Latsch, K., Dietrich, G., Wintermeyer, E., Schinke, B., Schwender, S., Kim, K.S., Eigenthaler, M., and Frosch, M. (2002b) Fibronectin mediates Opc-dependent internalization of *Neisseria meningitidis* in human brain microvascular endothelial cells. *Mol Microbiol* **46**: 933-946.
- van der Woude, M.W., and Baumber, A.J. (2004) Phase and antigenic variation in bacteria. *Clin Microbiol Rev* **17**: 581-611, table of contents.
- Virji, M., Makepeace, K., Ferguson, D.J., Achtman, M., and Moxon, E.R. (1993a) Meningococcal Opa and Opc proteins: their role in colonization and invasion of human epithelial and endothelial cells. *Mol Microbiol* **10**: 499-510.
- Virji, M., Saunders, J.R., Sims, G., Makepeace, K., Maskell, D., and Ferguson, D.J. (1993b) Pilus-facilitated adherence of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells: modulation of adherence phenotype occurs concurrently with changes in primary amino acid sequence and the glycosylation status of pilin. *Mol Microbiol* **10**: 1013-1028.
- Virji, M., Makepeace, K., and Moxon, E.R. (1994) Distinct mechanisms of interactions of Opc-expressing meningococci at apical and basolateral surfaces of human endothelial cells; the role of integrins in apical interactions. *Mol Microbiol* **14**: 173-184.
- Virji, M. (2009) Pathogenic neisseriae: surface modulation, pathogenesis and infection control. *Nat Rev Microbiol* **7**: 274-286.
- Vitovski, S., and Sayers, J.R. (2007) Relaxed cleavage specificity of an immunoglobulin A1 protease from *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **75**: 2875-2885.
- Voloshin, S.A., and Kaprelyants, A.S. (2004) Cell-cell interactions in bacterial populations. *Biochemistry (Mosc)* **69**: 1268-1275.
- Voulhoux, R., Bos, M.P., Geurtsen, J., Mols, M., and Tommassen, J. (2003) Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science* **299**: 262-265.
- Wagner, V.E., and Iglewski, B.H. (2008) *P. aeruginosa* Biofilms in CF Infection. *Clin Rev Allergy Immunol* **35**: 124-134.

- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* **1**: 945-951.
- Wall, D., and Kaiser, D. (1999) Type IV pili and cell motility. *Mol Microbiol* **32**: 1-10.
- Wang, J., Gray-Owen, S.D., Knorre, A., Meyer, T.F., and Dehio, C. (1998) Opa binding to cellular CD66 receptors mediates the transcellular traversal of *Neisseria gonorrhoeae* across polarized T84 epithelial cell monolayers. *Mol Microbiol* **30**: 657-671.
- Wang, J.A., Meyer, T.F., and Rudel, T. (2008) Cytoskeleton and motor proteins are required for the transcytosis of *Neisseria gonorrhoeae* through polarized epithelial cells. *Int J Med Microbiol* **298**: 209-221.
- Warren, M.J., and Jennings, M.P. (2003) Identification and characterization of pptA: a gene involved in the phase-variable expression of phosphorylcholine on pili of *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **71**: 6892-6898.
- Watarai, M., Funato, S., and Sasakawa, C. (1996) Interaction of Ipa proteins of *Shigella flexneri* with alpha5beta1 integrin promotes entry of the bacteria into mammalian cells. *J Exp Med* **183**: 991-999.
- Weksler, B.B., Subileau, E.A., Perriere, N., Charneau, P., Holloway, K., Leveque, M., Tricoire-Leignel, H., Nicotra, A., Bourdoulous, S., Turowski, P., Male, D.K., Roux, F., Greenwood, J., Romero, I.A., and Couraud, P.O. (2005) Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *Faseb J* **19**: 1872-1874.
- Welch, M.D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D.A., and Mitchison, T.J. (1998) Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science* **281**: 105-108.
- Weyand, N.J., Lee, S.W., Higashi, D.L., Cawley, D., Yoshihara, P., and So, M. (2006) Monoclonal antibody detection of CD46 clustering beneath *Neisseria gonorrhoeae* microcolonies. *Infect Immun* **74**: 2428-2435.
- Whitchurch, C.B., and Mattick, J.S. (1994) Characterization of a gene, pilU, required for twitching motility but not phage sensitivity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **13**: 1079-1091.
- Winther-Larsen, H.C., Hegge, F.T., Wolfgang, M., Hayes, S.F., van Putten, J.P., and Koomey, M. (2001) *Neisseria gonorrhoeae* PilV, a type IV pilus-associated protein essential to human epithelial cell adherence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 15276-15281.

- Winther-Larsen, H.C., Wolfgang, M., Dunham, S., van Putten, J.P., Dorward, D., Lovold, C., Aas, F.E., and Koomey, M. (2005) A conserved set of pilin-like molecules controls type IV pilus dynamics and organelle-associated functions in *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* **56**: 903-917.
- Wolfgang, M., van Putten, J.P., Hayes, S.F., and Koomey, M. (1999) The *comP* locus of *Neisseria gonorrhoeae* encodes a type IV prepilin that is dispensable for pilus biogenesis but essential for natural transformation. *Mol Microbiol* **31**: 1345-1357.
- Wolfgang, M., van Putten, J.P., Hayes, S.F., Dorward, D., and Koomey, M. (2000) Components and dynamics of fiber formation define a ubiquitous biogenesis pathway for bacterial pili. *Embo J* **19**: 6408-6418.
- Yasukawa, K., Martin, P., Tinsley, C.R., and Nassif, X. (2006) Pilus-mediated adhesion of *Neisseria meningitidis* is negatively controlled by the pilus-retraction machinery. *Mol Microbiol* **59**: 579-589.
- Yazdankhah, S.P., and Caugant, D.A. (2004) *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state. *J Med Microbiol* **53**: 821-832.
- Yazdankhah, S.P., Kriz, P., Tzanakaki, G., Kremastinou, J., Kalmusova, J., Musilek, M., Alvestad, T., Jolley, K.A., Wilson, D.J., McCarthy, N.D., Caugant, D.A., and Maiden, M.C. (2004) Distribution of serogroups and genotypes among disease-associated and carried isolates of *Neisseria meningitidis* from the Czech Republic, Greece, and Norway. *J Clin Microbiol* **42**: 5146-5153.
- Yi, K., Rasmussen, A.W., Gudlavalleti, S.K., Stephens, D.S., and Stojiljkovic, I. (2004) Biofilm formation by *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **72**: 6132-6138.
- Yoshida, T., Kim, S.R., and Komano, T. (1999) Twelve pil genes are required for biogenesis of the R64 thin pilus. *J Bacteriol* **181**: 2038-2043.
- Zarantonelli, M.L., Huerre, M., Taha, M.K., and Alonso, J.M. (2006) Differential role of lipooligosaccharide of *Neisseria meningitidis* in virulence and inflammatory response during respiratory infection in mice. *Infect Immun* **74**: 5506-5512.
- Zhao, S., Tobiason, D.M., Hu, M., Seifert, H.S., and Nicholas, R.A. (2005) The *penC* mutation conferring antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* arises from a mutation in the PilQ secretin that interferes with multimer stability. *Mol Microbiol* **57**: 1238-1251.